

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Bioteekniikka

2012

Miia Holmström

MITOKONDRIAALISEN DNA:N MÄÄRÄN MUUTOKSET GEENIMUUNNELTUIJEN HIIRIEN RASVAKUDOKSISSA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Miia Holmström

MITOKONDRIAALISEN DNA:N MÄÄRÄN MUUTOKSET GEENIMUUNNELTUJEN HIIRIEN RASVAKUDOKSISSA

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää onko geenimuunneltujen hiirien rasvakudosten mitokondriaalisessa DNA:ssa määrällisiä muutoksia verrattuna villityyppiin. Tutkimuksessa käytettiin sekä ruskeaa että valkoista rasvakudosta, päätutkimus keskittyi kuitenkin ruskeaan rasvaan. Tutkimus haluttiin tehdä, koska osa geenimuunnelluista hiiristä lihoo (Neuropeptidi Y – ja poistogeeniset α_{2A} -hiiret) ja osa ei (poistogeeniset α_{2AC} –hiiret). Syytä tähän ei tiedetä. Tutkimuksessa selvitettiin, onko näillä hiirillä poikkeava määrä mitokondriaalista DNA:ta rasvakudoksissa.

Kaikki tutkimusnäytteet olivat peräisin laboratorio-olosuhteissa elävien hiirten rasvakudoksista. Hiiristä 3/5 oli geeninmuunneltuja ja 2/5 niin sanottuja villityyppejä (wild-type). Geenimuunnellut hiiret olivat poistogeeninen α_{2A} ja α_{2AC} - sekä NPY:tä yli-ilmentäviä hiiriä.

DNA eristettiin näytteistä kaupallisella kitillä (Gentra Puregene tissue kit, Qiagen), ja ne ajettiin reaaliaikaisessa kvantitatiivisessa polymeraasiketjureaktiossa (real-time qPCR). Tutkimuksen tulokset laskettiin suhteellisella PCR -menetelmällä käyttäen hyväksi standardisuora -menetelmää. Tulokset analysoitiin yksisuuntaisella ANOVA –testillä käyttäen GraphPad Prism –ohjelmaa.

Tulosten perusteella ainoastaan poistogeenisellä α_{2AC} – hiirillä, etenkin naarailla, olisi enemmän mitokondriaalista DNA:ta verrattuna villityyppiin. Tämä tarkoittasi sitä, että tällä hiirityypillä olisi enemmän mitokondrioita, joka voisi osittain selittää, miksi ne eivät liho runsasrasvaisesta dieetistä huolimatta. Muiden hiirityyppien mitokondriaalisen DNA:n määrässä ei ollut eroa verrattuna villityyppiin.

ASIASANAT: rasvakudos, ruskean rasvakudoksen mitokondriot, mitokondriaalinen DNA, DNA eristys, PCR

Miia Holmström

CHANGES IN MITOCHONDRIAL DNA COPY NUMBER IN THE ADIPOSE TISSUES OF GENETICALLY ENGINEERED MICE

The purpose of the study was to determine changes in the amount of mitochondrial DNA in adipose tissue. A comparison was made between genetically engineered and wild-type mice. Both white and brown adipose tissue was used but the main research focused on brown adipose tissue. The inspiration for the research was the fact that some genetically engineered mice put on weight (Neuropeptide Y overexpressing and α_{2A} knockout mice) while others (α_{2AC} knockout mice) do not. The reason for this is unknown. The purpose was to see if there are differences in the amount of mitochondrial DNA.

All the samples were from mice living in laboratory conditions. 3/5 of the mice were genetically engineered while the rest were wild-type mice. The genetically engineered mice were Neuropeptide Y overexpressing mice and α_{2A} and α_{2AC} knockout mice.

The DNA was extracted with a commercial kit (Gentra Purigene tissue kit, Qiagen). After the extraction, the DNA samples were examined by a real-time quantitative polymerase chain reaction. The final results were calculated using a relative PCR method utilizing the standard curve method. The results were analyzed with a one-way ANOVA test using GraphPad Prism software.

According to the results only the α_{2AC} knockout mice, especially female ones, had more mitochondrial DNA than the wild-type mice. This means that this mouse type has more mitochondria which might explain why they do not put on weight even though they are on a high-fat-diet. There were no statistical changes in the amount of mitochondrial DNA in other mice types.

KEYWORDS: adipose tissue, mitochondria in brown adipose tissue, BAT, mitochondrial DNA, DNA extraction, PCR

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	7
2 RASVAKUDOKSET	9
2.1 Ruskea rasva	9
2.1.1 Irtikytijäproteiini (UCP-1)	10
2.2 Valkoinen rasva	10
3 HIIRILINJAT	11
3.1 α_2 – adrenoseptori	11
3.1.1 Tutkimuksessa käytetyt α_2 - hiiret	12
3.2 Neuropeptidi Y (NPY)	13
4 MITOKONDRIO	14
4.1 Rakenne	14
4.2 Mitokondriaalinen DNA	15
5 DNA:N ERISTYS	17
5.1 DNA:n eristäminen ja puhdistaminen	17
5.2 DNA:n määrä ja puhtaus	19
6 POLYMEERAASIKETJUREAKTIO	21
6.1 PCR:n periaate	21
6.2 Kohde - DNA	23
6.3 Polymeeraasiketjureaktiota haittaavat (inhiboivat) asiat	23
6.4 Kvantitatiivinen reaaliaikainen polymeeraasiketjureaktio	24
6.4.1 Signaali	24
6.4.2 Alukkeet	26
6.4.3 Tulokset ja niiden analysointi	26
6.4.4 PCR menetelmät	28
7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	30
7.1 Hiiret	30
7.2 DNA:n eristys kaupallisella kitillä	31
7.3 DNA:n puhtaus ja laimennokset	33

7.4 PCR	33
8 TULOKSET JA POHDINTA	37
8.1 DNA eristystulokset	37
8.2 PCR - ajojen kuvat	43
8.3 Mitokondriaalisen DNA:n määrän muutoksen	45
8.3.1 Muutokset ruskeassa rasvassa	45
8.3.2 Muutokset valkoisessa rasvassa	50
9 JOHTOPÄÄTÖKSET	54
LÄHTEET	56

LIITTEET

Liite 1. Tilastolliset testit ruskean rasvan tuloksista.

Liite 2. Tilastolliset testit valkoisen rasvan tuloksista.

KUVAT

Kuva 1. Nisäkkäiden adrenoseptorit ja niiden alatyypit (11, tietoruutu L5).	11
Kuva 2. Mitokondrion sisärakenne (6: 90).	14
Kuva 3. Mitokondriaalinen kromosomi (23: 454).	16
Kuva 4. DNA:n eristäminen silikamenetelmällä (28: 34).	19
Kuva 5. PCR:n periaate: tuotteen monistuminen kolmessa ensimmäisessä syklissä (28:148 -149).	22
Kuva 6. Hairpin koettimeen toiminta: fluoresoivan signaalin syntyminen (28: 160).	25
Kuva 7. Sulamiskäyrän samanmuotoisuus, alukkeena CYT B, näytteet α_{2A} – KO - ja villityyppi naaraat.	44
Kuva 8. CYT B alukkeen standardisuora, näytteet α_{2A} – KO - ja villityyppi naaraat.	44
Kuva 9. Mitokondrioiden eroja ruskeassa rasvassa NPY –hiiren ja villityypin välillä (Oulun yliopisto).	54

KUVAAJAT

Kuvaaja 1. DNA - pitoisuus NPY ja villityyppi: BAT.	37
Kuvaaja 2. DNA - pitoisuus α_{2A} – KO uros: ruskea (BAT) ja valkoinen (WAT) rasva.	38

Kuvaaja 3. DNA - pitoisuus α_{2A} – KO naaras: ruskea (BAT) ja valkoinen (WAT) rasva.	38
Kuvaaja 4. DNA - pitoisuus α_{2AC} – KO uros: ruskea (BAT) ja valkoinen (WAT) rasva.	39
Kuvaaja 5. DNA - pitoisuus α_{2AC} – KO naaras: ruskea (BAT) ja valkoinen (WAT) rasva.	39
Kuvaaja 6. DNA - pitoisuus villityyppi uros: ruskea (BAT) ja valkoinen (WAT) rasva.	40
Kuvaaja 7. DNA - pitoisuus villityyppi naaras: ruskea (BAT) ja valkoinen (WAT) rasva.	40
Kuvaaja 8. DNA:n puhtaus (A_{260}/A_{280} ja A_{260}/A_{230}) α_{2A} – KO uros, näyte ruskeasta rasvasta.	41
Kuvaaja 9. DNA:n puhtaus suhdeluku (A_{260}/A_{280} ja A_{260}/A_{230}) α_{2A} – KO uros, näyte valkoisesta rasvasta.	41
Kuvaaja 10. DNA – pitoisuudet painoluokittain α_2 – KO - uroksissa.	42
Kuvaaja 11. DNA – pitoisuudet painoluokittain α_2 – KO - naaraat.	43
Kuvaaja 12. Ruskean rasvan mitokondriaalisen DNA:n erot NPY hiirien ja villityyppien välillä.	46
Kuvaaja 13. Ruskean rasvan mitokondriaalisen DNA:n määrän hajonnat NPY – hiirissä ja villityypissä.	46
Kuvaaja 14. Ruskean rasvan mitokondriaalisen DNA:n erot α_2 -KO -uroshiirien ja villityyppien välillä.	47
Kuvaaja 15. Ruskean rasvan mitokondriaalisen DNA:n määrän hajonnat α_2 -KO - ja villityypin uroshiirissä.	48
Kuvaaja 16. Ruskean rasvan mitokondriaalisen DNA:n erot α_2 -KO -naarashiirien ja villityyppien välillä.	49
Kuvaaja 17. Ruskean rasvan mitokondriaalisen DNA:n määrän hajonnat α_2 -KO - ja villityypin naarashiirissä.	49
Kuvaaja 18. Valkoisen rasvan mitokondriaalisen DNA:n erot α_2 -KO uroshiirien ja villityyppien välillä.	50
Kuvaaja 19. Valkoisen rasvan mitokondriaalisen DNA:n määrän hajonnat α_2 -KO – ja villityypin uroshiirissä.	51
Kuvaaja 20. Valkoisen rasvan mitokondriaalisen DNA:n erot α_2 -KO -naarashiirien ja villityyppien välillä.	52
Kuvaaja 21. Valkoisen rasvan mitokondriaalisen DNA:n määrän hajonnat α_2 -KO – ja villityypin naarashiirissä.	52

TAULUKOT

Taulukko 1. PCR – tulosten kriittisiä kohtia.	27
Taulukko 2. Tutkimuksessa käytettyjen hiirien lukumäärät tyypeittäin.	30
Taulukko 3. PCR ajo-olosuhteet (43, 44).	34
Taulukko 4. Tutkimuksessa käytetyt alukkeet.	35
Taulukko 5. DNA näytteiden lasku: α_{2A} – KO uroksen CYT B geeni verrattuna villityyppiin.	36
Taulukko 6. RNA näytteiden lasku: NPY hiiren CYT B geeni verrattuna villityyppiin.	36

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI) SANASTO

Lyhenne	Lyhenteen selitys
$\alpha_{2(A/AC)} -KO$	α_2 – adrenoceptorinen knockout -hiiri, geenimuunneltu hiiri, jolta on sammutettu α_2 –adrenerginen reseptori, alatyypit α_{2A} ja α_{2AC}
NPY	Neuropeptidi Y
HFD	High-Fat-Diet, runsasrasvainen dieetti. Koostuu 45 % kovasta rasvasta
BAT	Ruskea rasvakudos, lyhenne sanoista brown adipose tissue
WAT	Valkoinen rasvakudos, lyhenne sanoista white adipose tissue
mtDNA	Mitokondriaalinen DNA
cDNA	Komplementaarinen DNA, valmistetaan RNA:sta käänteistranskriptiolla
UCP-1	ns. irtikytijäproteiini, lyhenne sanoista uncoupling protein 1, ruskealle rasvalle tyypillinen proteiini
NADH 2	NADH 2 hydrogenaasi alayksikkö 2 -proteiini, tuotetaan mitokondriossa
CYT B	Sytokromi B -proteiini, tuotetaan mitokondriossa
PCR	Polymeraasiketjureaktio

1 JOHDANTO

Tutkimus tehtiin Turun yliopistolle, Farmakologian, lääkekehityksen ja lääkehoidon oppiaineelle. Tämän työn tutkimus liittyy suurempaan kokonaisuuteen, jossa tutkitaan erilaisten geenimuunneltujen hiirien elimistön muutoksia, muun muassa rasvan määrää ja muutoksia aivoissa, hiirien ollessa runsasrasvaisella dieetillä eli High-Fat – dieetillä, HFD. Dieetissä hiirille annetaan ruokaa, joka koostuu 45 % kovasta rasvasta.

Tutkimukseen valitut hiiret olivat pääasiassa poistogeenisestä α_2 – hiirilinjasta. Näillä hiirillä on sammutettu α_2 – adrenoseptoreita. Adrenoseptoreiden sammuttamisen jälkeen, hiirillä erittyy muun muassa enemmän noradrenaliinia. Viimeaikaisten tutkimusten perusteella tiedetään, että nämä hiiret reagoivat HFD – dieettiin eritavalla kuin villityyppi hiiret. Poistogeenisistä α_2 –hiiristä eli α_2 – KO –hiiristä, on tutkittu, että alatyypin α_{2AC} – KO -hiiri, jolla on sammutettu kaksi adrenoseptoria, ei liho dieetillä kuten villityyppi. Sen sijaan alatyypin α_{2A} – KO – hiiri, jolla on vain yksi adrenoseptori sammutettu, reagoi dieettiin kuten villityyppi; lihomalla. Syytä sille miksi α_{2AC} – KO – hiiri ei liho, ei tiedetä. Tätä yritettiin selvittää tässä opinnäytetyössä sekä muissa tutkimuksissa. HFD – dieetin tutkimustuloksia ei ole vielä julkaistu missään. Ilmeisesti asiaa tutkitaan nyt ensimmäisiä kertoja.

Tässä tutkimuksessa selvitettiin, onko α_{2AC} - ja α_{2A} – KO – hiirillä määrällisiä muutoksia ruskean rasvan (BAT) mitokondriaalisessa DNA:ssa verrattuna villityypin. Lisäksi tutkimukseen saatiin näytteitä poistogeenisen α_2 – hiirilinjan lisäksi Neuropeptidi Y – hiirilinjan eli NPY -hiirien ruskeasta rasvasta. Tutkimuksissa on aikaisemmin selvinnyt, että NPY –hiiret, joilla neuropeptidi Y:tä erittyy ylimäärin, lihovat enemmän kuin villityyppi.

Tämän opinnäytetyön hypoteesina oli, että α_{2AC} – KO – hiiret eivät liho, koska niillä on mitokondrioita enemmän kuin villityypillä. Koska tiedetään, että mitokondriot liittyvät energian palamiseen elimistössä ja mitokondrioita on runsaasti ruskeassa rasvassa, oletettiin, että α_{2AC} – KO – hiirillä olisi ruskeaa

rasvaa enemmän kuin normaalisti tai ruskeassa rasvassa olisi enemmän mitokondrioita kuin tavallisesti. NPY –hiirillä puolestaan hypotesina oli, että ne lihovat enemmän verrattuna villityyppiin, koska niillä olisi vähemmän mitokondriaalista DNA:ta. Mitokondriaalisen DNA:n määrä selvitettiin käyttämällä polymeraasiketjureaktiota (PCR). Laboratoriotutkimukset perustuivat lähteeseen 1.

2 RASVAKUDOKSET

Nisäkkäillä on kahta erilaista rasvakudosta: valkoista (WAT) ja ruskeaa rasvakudosta (BAT). Rasvakudoksessa on kahdenlaisia rasvasoluja eli adiposyytteja. Valkoisen rasvan rasvasolujen tarkoitus on varastoida energiaa, kun taas ruskean rasvan rasvasolut kuluttavat energiaa lämmöntuottoprosessissa. (2, 3)

2.1 Ruskea rasva

Vaikka ruskea rasva on löydetty jo vuonna 1551, sitä on alettu tutkia paremmin vasta 1900 luvulla. Löytäjänä vuonna 1551 oli sveitsiläinen luonnontieteilijä Konrad Gesner. (3, 4) Ruskeaa rasvakudosta löytyy ainoastaan nisäkkäiltä; ihmisillä ruskeaa rasvaa on etenkin vastasyntyneillä. Aikuisten ruskeasta rasvasta tutkijat ovat olleet erimieltä, mutta uusimpien tutkimusten mukaan myös aikuisilta löytyy toimivaa ruskeaa rasvaa. (2, 4, 5)

Ruskean rasvan tärkein tehtävä on muuttaa ruoasta saatu energia lämmöksi. Lämmöntuotosta ruskeassa rasvassa vastaa sympaattinen hermosto vapauttamalla noradrenaliinia. Sympaattista hermostoa ohjaa aivojen autonominen keskus eli tahdosta riippumaton osa. Se aktivoituu aina, kun elimistö tarvitsee lisälämpöä. Tämän vuoksi esimerkiksi nisäkkäät pystyvät elämään kylmissä olosuhteissa, jopa + 4 celsius asteessa, ilman lihasväristyksiä. Ruskean rasvan lämmöntuottoon ei siis liity lihasväristyksiä. (3, 4)

Ruskea rasvakudos koostuu monista pienistä lipidipisaroista. Siinä on runsaasti mitokondrioita, joista tulee rasvan ruskea väri. (6) Ruskeaa rasvaa tutkitaan jatkuvasti lisää. Siitä tutkitaan muuan muassa, voidaanko sitä käyttää hyväksi liikalihavuuden ja muiden siitä aiheutuvien metabolisten tautien hoidossa. (4)

2.1.1 Irtikytijäproteiini (UCP-1)

Lämmöntuottoon kuuluu olennaisesti irtikytijäproteiini eli uncoupling protein 1, UCP-1. UCP-1 -proteiinit ovat ruskean rasvan mitokondrioiden sisäkalvolla sijaitsevia proteiineja, jotka muodostavat protonikanavia. Lämmöntuottoprosessissa ne kytkevät irti elektroninsiirron ja oksidatiivisen fosforylaation. Tämän seurauksena protonigradientin energiasta syntyy ATP:n sijaan lämpöä. (6, 7) UCP-1 on mitokondriaalinen proteiini, mutta sen geeni ovat tumassa. (3, 4)

2.2 Valkoinen rasva

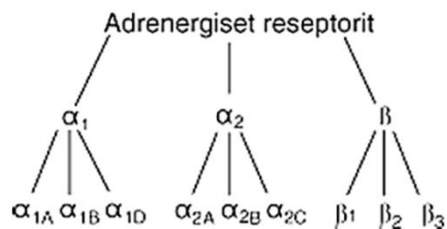
Valkoinen rasva koostuu isoista lipidipisaroista ja siinä on vähemmän mitokondrioita kuin ruskeassa rasvassa. (8, 9) Valkoisen rasvan sisältämät rasvasolut varastoivat energiaa syntetisoimalla rasvahappoja. Rasvahapot esteröityvät rasvoiksi, jotka muodostavat lipidipisaroita rasvasolujen sisälle. Kun energiaa tarvitaan käyttöön, varastoidut rasvapisarot hydrolysoituvat glyseroliksi ja rasvahapoiksi. Glyserolin ja rasvahappojen hapettuessa, energiaa saadaan takaisin käyttöön. (6)

3 HIIRILINJAT

Tutkimuksessa käytetyt näytteet saatiin kahdesta eri hiirilinjasta: poistogeenisestä α_2 – adrenoseptori - ja neuropeptidi Y –hiiristä. Tuloksia verrattiin laboratoriohiireen (*Mus musculus*) C57B/6J.

3.1 α_2 – adrenoseptori

Solukalvolla sijaitsevat α – adrenoseptorit ovat G-proteiineihin kuuluvia reseptoreita, jotka aktivoituvat noradrenaliini -välittäjäaineen ja adrenaliini -hormonin vaikutuksesta. Sympaattinen hermosto vastaa noradrenaliinin eristyksestä, adrenaliini puolestaan erittyy lisämunuaisesta. Reseptorit jaetaan nisäkkäillä kolmeen eri alaryhmään: α_1 , α_2 ja β . Reseptorit vaikuttavat elimistössä muun muassa sydämen ja sileiden lihasten toimintaan. Kaikki adrenoseptorit alatyyppeineen on esitetty kuvassa 1. (10, 11)



Kuva 1. Nisäkkäiden adrenoseptorit ja niiden alatyypit (11, tietoruutu L5).

α_2 – adrenoseptorilla on kolme alatyyppiä: α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} . Esimerkiksi ihmisellä alatyypit A ja B koostuvat 450 aminohaposta ja alatyyppi C 461 aminohaposta (10). Ihmisellä reseptoreita koodaa kolme eri geeniä: alatyypin α_{2A} :n geeni sijaitsee kromosomeissa 10, α_{2B} :n geenit ovat puolestaan kromosomissa 2 ja α_{2C} :n geenit kromosomi 4:ssä (12). α_2 -reseptorit säätelevät hermoärsytyksen seurauksena syntyviä noradrenaliinin ja muiden hermoston välittäjäaineiden määrää. Reseptoreita on muun muassa verisuonissa, keskushermostossa ja rasvakudoksessa (11). Yhdessä keskushermoston kanssa, α_2 – adrenoseptorit

säätävät muun muassa verenpainetta ja insuliinin eritystä sekä kehon lämpötilaa ja mielialaa. (13, 14)

Tutkittaessa hiirien α_2 – adrenoseptoreita on selvinnyt, että α_{2A} – adrenoseptoreilla on muun muassa iso rooli insuliinin erityksen rajoittamisessa ja α_{2C} – adrenoseptorit hillitsevät tietynlaista käyttäytymistä, kuten säikähähdysreaktiota ja aggressiivisuutta. (12, 14) α_{2B} – adrenoseptorit puolestaan vaikuttavat verisuonten supistumiseen joissakin osissa verisuonistoa. (12)

3.1.1 Tutkimuksessa käytetyt α_2 - hiiret

Tutkimuksessa käytettiin α_2 – hiiristä kahta erilaista tyyppiä: toisesta hiirityypistä oli sammutettu α_{2A} – adrenoseptori ja toisesta oli sammutettu α_{2A} - ja α_{2C} – adrenoseptorit. Hiirtä, jolla on sammutettu α_{2A} – adrenoseptori, kutsutaan poistogeeniseksi α_{2A} –hiireksi eli α_{2A} – KO –hiireksi. Poistogeeninen α_{2AC} –hiiri on puolestaan α_{2AC} – KO –hiiri. Sammuttamisen jälkeen, adrenoseptorit eivät toimi, kuten niiden kuuluisi. α_{2A} – KO -hiiri on saatu sammuttamalla geenin toiminta, α_{2AC} –KO -hiiri puolestaan on luotu risteyttämällä α_{2A} – KO –hiiri ja α_{2C} – KO -hiiret. (12, 15)

On tutkittu, että α_{2A} – KO – hiirillä muuan muassa plasman noradrenaliinipitoisuus (14) ja verenpaine nousevat, koska toimiessaan oikein α_{2A} – adrenoseptoreilla on estävä vaikutus noradrenaliinin erittymiseen. Näiden lisäksi α_{2A} – KO – hiirillä sydän lyö tiheämmin. Sen sijaan tällä hiirityypillä veren glukoosipitoisuus on matalampi kuin villityypillä. (13, 16)

α_{2C} – KO – hiirillä noradrenaliinipitoisuus on α_{2A} – KO – hiiriäkin korkeampi, ja myös adrenaliinin taso on korkea (14). Näillä hiirillä esiintyy aggressiivisuutta niiden ollessa eristettynä muista hiiristä ja säikähähdysreaktio on voimakkaampi kuin villityypihiirillä. (17)

Aikaisemmin ei ole tehty tutkimuksia, miten HFD -dieetti vaikuttaa α_2 – KO – hiirien painoon. Tutkimusryhmä, jonka alaisuudessa tehtiin tämän opinnäytetyön tutkimukset, on tutkinut dieetin vaikutusta. Alustavien tulosten

mukaan α_{2A} – KO – hiiret, sekä urokset että naaraat, lihovat kuten villityypit, mutta α_{2AC} – KO – hiiriin dieetti ei vaikuta. Tutkimustuloksia ei ole vielä julkaistu.

3.2 Neuropeptidi Y (NPY)

Neuropeptidi Y eli NPY on hermoston välittäjäaine, joka koostuu 36 aminohaposta (18). NPY vaikuttaa aivojen hypothalamuksen kautta elimistön energiatasapainoon. Se vaikuttaa elimistössä parantamalla ruokahalua, joka voi esimerkiksi johtaa sairaalloon ylipainoon. Lisäksi NPY – välittäjäaineen liiallinen määrä vaikuttaa elimistössä muun estämällä ruskean rasvan lämmöntuottoa, ja se on yhteydessä insuliinin liikaeritykseen. (18, 19)

Tutkimuksessa käytettiin hiiriä, joilla esiintyy ylimäärin NPY - välittäjäainetta. NPY:n ylituotanto keskittyy sympaattisen hermoston ääreisosiin ja aivojen noradrenaliinia erittävän osaan. Näillä hiirillä muun muassa valkoisen rasvan määrä elimistössä kasvaa, vaikka hiiret eivät ylensyö tai niiden painossa ei tapahdu merkittäviä muutoksia verrattuna villityyppeihin. Lopulta elimistön muutoksien takia myös insuliinin määrä kasvaa ja glukoosin sietokyky laskee. (19)

4 MITOKONDRIO

Mitokondriot ovat jyväsiä, joiden ympärillä on kaksi kalvoa. Ihmisellä on keskimäärin 300–2000 mitokondriota yhdessä solussa (20). Niitä on kaikissa tumallisissa soluissa, ja niiden tärkein tehtävä on tarjota soluille energiaa. Energiaa muodostuu oksidatiivisen fosforylaation kautta eli adenosiinitrifosfaatin synteesissä (ATP-syntaasi). (21, 22)

4.1 Rakenne

Mitokondriot ovat keskimäärin 0,5 - 2 μm paksuisia, mutta niiden pituus vaihtelee. Rakenteen voi erottaa elektronimikroskoopilla. Mitokondrio koostuu ulko – ja sisäkalvosta, jotka ovat noin 6-8 nm paksuja. Näiden välille jää ohut tila, jossa pienet molekyylit ja ionit liikkuvat vapaasti ulkokalvon läpi. Kalvot ympäröivät mitokondrion ydintä, jossa on monia aineenvaihdunnalle keskeisiä entsyymejä, kuten Krebsin syklin (sitruunahappokierron) entsyymit. (6, 22)



Kuva 2. Mitokondrion sisärakenne (6: 90).

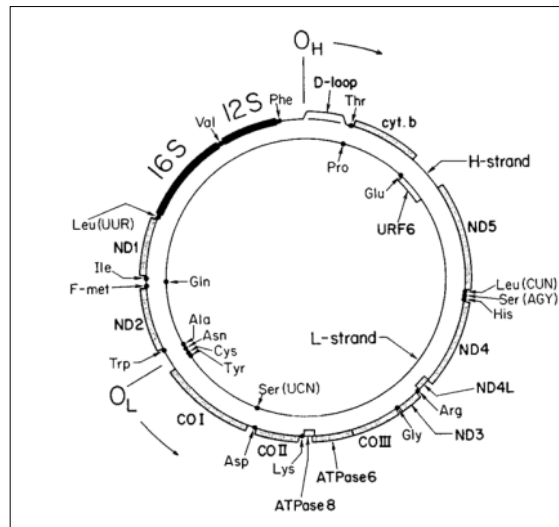
Kuvassa 2 on mitokondrion rakenne. Ulkokalvo koostuu proteiineista ja lipideistä. Ulkokalvo läpäisee noin 10 kD:hen asti. Molekyylit kulkevat kalvon läpi niin sanottujen poriinien kautta, jotka ovat proteiinien muodostamia hydrofiilisia eli vesihakuisia käytäviä. Sisäkalvo puolestaan on huonosti läpäisevä kalvo, josta vetyionit ja sähköisesti varautuneet yhdisteet eivät pääse

läpi. Sisäkalvo koostuu suurimmaksi osaksi proteiineista. Lisäksi kalvossa on mukana vähän lipidejä. Sisäkalvo tekee ytimeen poimutusta eli niin sanottuja kristoja. Kalvon sisältämät kalvoproteiinit ovat tärkeitä biologisessa hapetusreaktiossa ja ne osallistuvat solujen ATP – syntaasiin eli energiantuottoon. Matriksi koostuu viskoosisesta nesteestä, jossa on ribosomeja, DNA:ta ja RNA:ta. (3, 6)

4.2 Mitokondriaalinen DNA

Vaikka suurin osa mitokondrion proteiineista syntyy tuman DNA:n tuottamana, myös mitokondriaalinen DNA (mtDNA) sisältää geenejä, jotka koodaavat osaa mitokondrion proteiineista sekä tarvittavia RNA:ta. Esimerkiksi ihmisen solujen mtDNA koodaa 13 proteiinia, jotka liittyvät oksidatiiviseen fosforylaatioon. Proteiinien lisäksi niissä on informaatio kahteen ribosomaaliseen RNA:han: 22S ja 16S, sekä 22:een siirtäjä RNA:han. (6, 22) mtDNA:n geneettiset koodit eroavat jonkin verran ”yleisestä” geneettisestä koodista. Esimerkiksi koodi UGA, joka yleisesti merkitsee lopetuskoodia, koodaakin mtDNA:ssa tryptofaania. (23)

mtDNA:n kahdentuminen tapahtuu matriksissa. Eläinsolujen mtDNA sisältää vain eksoneita eli alueita, joissa on informaatio proteiinien aminohappojärjestyksestä. Informaatio on tiukkaan pakattu. Kuvassa 3 on näkymään mitokondriaalinen kromosomi. Intronit ja histonit puuttuvat mtDNA:sta. (20) Intronit ovat genomisessa DNA:ssa olevia jaksoja, joissa ei ole informaatiota. Histonit ovat puolestaan proteiineja, joihin genomisen DNA on kiinnittynyt. Proteiineja koodaavat alueet ovat siis suoraan peräkkäin tai niiden välillä on vain muutama nukleotidi. (6, 20, 24)



Kuva 3. Mitokondriaalinen kromosomi (23: 454).

Eläinsolujen mtDNA koodaa proteiineja, jotka liittyvät oksidatiivisen fosforylaation elektroninsiirron komplekseihin eli yhdistymiin. mtDNA koodaa yhdistymä 1:ssä 7 proteiinin alayksikköä, yhdistymä 3:ssa vain yhtä proteiinia ja yhdistymä 4:ssa kolmea eri proteiinin alayksikköä. Yhdistymien proteiinien alayksiköt ovat myös yhteydessä muihin alayksikköihin, joita koodaa tuman DNA. (20, 22)

Tutkimukseen valittiin kaksi yhdistymien geeniä, NADH hydrogenaasi alayksikkö 2 eli NADH 2 ja sytokromi B eli CYT B. Kuvassa 3 NADH 2 on ND2. Lisäksi tarkoituksena oli ottaa mukaan myös yhdistymä 4:seen kuuluva sytokromi c oksidaasi alayksikkö 1 (20), mutta tämä jätettiin pois. Kuvassa 3 lyhennettynä CO 1. Poisjättämisen syynä oli yhdistymien geenien samankaltaisuus, DNA määrän pitäisi olla sama jokaisella geenillä mitattuna. Geenit valittiin viitteiden 1 ja 25 perusteella.

NADH 2 kuuluu yhdistymä 1:seen ja CYT B yhdistymä 3:seen. Nämä yhdistymät toimivat yhdessä yhdistymä 4 kanssa protonipumppuina eli ne siirtävät protoneja elektroninsiirtoketjussa. (6)

5 DNA:N ERISTYS

DNA, eli deoksiribonukleiinihappo, sisältää eliön perimän eli geenit eli geneettisen informaation, jonka avulla eliö pystyy elämään. Geneettinen informaatio koostuu DNA:ssa nukleotidiemäsjärjestyksestä. Kolme nukleotidiemästä muodostavat aina yhden koodisanan. (22) DNA sisältää kaiken informaation proteiinien ja entsyymien rakentamisesta, joka ohjaa solujen toimintaa. DNA koostuu fosfaattiryhmästä, sokeriosasta ja emäksestä. DNA – molekyyli on kaksinauhaista. Nauhat ovat kiertyneet ja muodostavat kolmeulotteisia rakenteita. Kolmiulotteiset rakenteet eivät ole sattumanvaraisia, vaan myös ne vaikuttavat geenien toiminnan säätelyyn. (6, 26)

DNA:ta on kahdenlaista: genomista ja mitokondriaalista. Mitokondriaalisesta DNA:sta on enemmän luvussa 4.2. Genominen DNA sijaitsee tumassa ja siinä on informaatio esimerkiksi ihmisen 48 kromosomille. Genomisen DNA:n koodi on universaalia, sama koodisto on sekä eukaryooteilla eli aitotumallisilla että prokaryooteilla eli alkeistumallisilla. Genomisen DNA:n geeniä koodaavien osien väleihin jää tyhjiä alueita, niin sanottuja introneita, jotka eivät koodaa mitään. Genominen DNA onkin suurikokoisempaa kuin mitokondriaalinen DNA. (6, 22)

5.1 DNA:n eristäminen ja puhdistaminen

DNA:n eristäminen on suhteellisen helppoa. DNA - näyte voi olla peräisin muun muassa kudospalasesta, verestä tai soluviljelmästä. (26) Tässä luvussa on kerrottu DNA:n eristämisestä kudoksesta, koska tutkimuksen DNA oli peräisin kudokappaleista.

Näyte täytyy aluksi homogenisoida eli kudokappale tulee hajottaa. Tarkoituksena on saada DNA ulos solukalvojen ja muiden solujen osien sisältä. Kudos voidaan hajottaa esimerkiksi proteinaasi K – entsyymillä, joka on eristetty *Tritirachium album* – homeesta ja se pystyy pilkkomaan proteiineja (27).

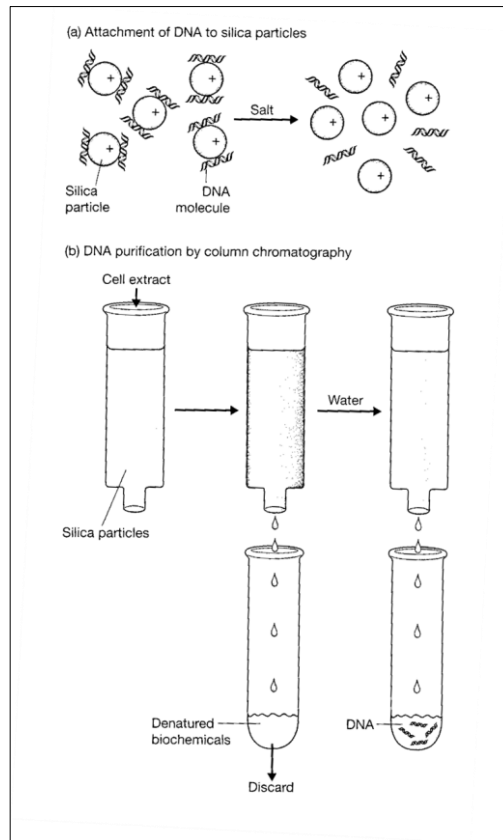
Proteinaasi K – entsyymi ei yksin hajota soluja, vaan hajotukseen käytetään myös EDTA:ta ja SDS:ää. EDTA:ta, eli etyleenitiamiinitetraetikkahappoa, tarvitaan estämään nukleaaasien toiminta, tällä estetään nukleotidien pilkkoutuminen. Lisäksi EDTA hajottaa soluseinämää. SDS, eli natriumlauryylisulfaatti, on puolestaan detergentti, joka poistaa lipidejä ja hajottaa solukalvoa. DNA:ta eristettäessä tarvitaan myös RNAasia, eli ribonukleasia, joka on RNA:ta pilkkova entsyymi. (26, 28)

Hajotetusta näytteestä pilkotaan seuraavaksi loputkin proteiinit ja ne poistetaan. Pilkotut proteiinit voidaan esimerkiksi poistaa saostuksella. Ne voidaan saostaa muun muassa käyttämällä fenolia tai fenoli-kloroformi – seosta. Tällä saostustavalla DNA kuitenkin katkeilee. Saostuneet proteiinit ja solujäämät voidaan erotella sentrifugilla. Sentrifugin jälkeen fenoli/fenoli-kloroformi – seos, yhdessä proteiinien ja muiden epäpuhtauksien kanssa, on putken pohjalla ja DNA on vesifaasissa putken yläosassa (26, 28) Proteiinien saostus voidaan tehdä myös suolalla kuten ammoniumasetaatilla (29).

Viimeisenä tarvitaan DNA saostus, joka tapahtuu alkoholilla, joko etanolilla tai isopropanolilla. Etanolilla saostaminen tapahtuu yleensä kylmässä, kun taas isopropanolisaostus voidaan tehdä huoneenlämmössä. Saostuneet polymeeriset nukleiinihapot voidaan kerätä talteen sentrifugilla tai keräämällä saostuneet DNA rihmat lasisauvan avulla pois. DNA liuotetaan lopuksi puskuriliuokseen (26, 28)

Perinteinen saostus voidaan korvata ionivaihtokromatografialla, joka erottelee molekyylit niiden elektronien sitoutumiskyvyn perusteella eli kuinka tiukasti ne sitoutuvat kromatografian matriisiin. DNA on negatiivisesti varautunut, joten tarvitaan positiivisesti varautunut matriisi. Sitoutuminen puolestaan poistetaan suolan avulla. Suolan lisääminen pylvääseen tapahtuu vaiheittain, jolloin ensimmäiseksi poistuvat proteiinit ja RNA. Suolakonsentraation lisääntyessä poistuu myös DNA. (28)

DNA voidaan myös puhdistaa silikamenetelmällä, joka on samantyyppinen menetelmä kuin ioninvaihtokromatografia.



Kuva 4. DNA:n eristäminen silikamenetelmällä (28: 34).

Kuvassa 4 on esitetty silikamenetelmän kaaviokuva. Siinä käytetään kaotrooppia, yleensä guanidiinihydrokloridia. Kaotrooppi hajottaa molekyyliä ympäröivän vesivaipan, jolloin DNA pystyy sitoutumaan tiukasti silikamatriisiin. DNA ladataan kaotrooppiliuoksessa pylvääseen, jossa DNA on sitoutuneena matriisiin liuoksen tullessa ulos. Epäpuhtaudet pestään puskuroidulla etanolilla, joka ajetaan pylvään läpi, samalla poistuvat myös kaotroopit. Pesujen jälkeen DNA irrotetaan matriisista laimean puskurin avulla. (26, 28)

5.2 DNA:n määrä ja puhtaus

DNA puhtautta ja määrää voidaan tutkia monella eri menetelmällä. Yksi käytetyimmistä menetelmistä on mitata DNA-liuoksessa olevien nukleotidien absorbanssia A_{260} nanometrissä (nm) spektrofotometrillä. DNA-liuoksen konsentraatio on suoraan verrannollinen kuinka paljon UV – valoa absorboituu

näytteeseen. Yleissääntönä on, että aallonpituudella 260 nm, 50 µl:a kaksijuosteista DNA:ta millilitrassa antaa tulokseksi 1,0. (26, 28)

Lisäksi spektrofotometrillä voidaan mitata näytteen puhtautta. Puhtaus mitataan kahdesta eri pisteestä: A_{260} ja A_{280} . Näille lasketaan suhdeluku, joka kertoo puhtaudesta. Puhtaalle DNA:lle suhdeluvun A_{260}/A_{280} tulee olla 1,8 ja puhtaalle RNA:lle 2,0. (28) Jos DNA:n suhdeluku on reilusti alle 1,8, näytteeseen on yleensä jäänyt proteiinia, joka absorboi 280 nm:ssä. Jos suhdeluku puolestaan nousee 1,8:sta, näytteessä voi olla RNA:n lisäksi esimerkiksi vapaita nukleotidejä. (26) Puhtautta voidaan tarkastella myös A_{260}/A_{230} suhdeluvusta. Suhdeluvun tulisi olla puhtaalle DNA:lle suurempi kuin A_{260}/A_{280} – suhdeluvun, noin 2,0. Jos suhdeluku on alle 1,8, näytteissä voi olla orgaanista ainetta kuten fenolia. Orgaaninen aine absorboi 230 nm:ssä, joten orgaaninen kontaminaatio ei välttämättä näy A_{260}/A_{280} – suhdeluvussa. Kontaminaatio voi haitata näytteiden jälkikäsittelyä, esimerkiksi PCR:n tehokkuutta. (30 [viitattu 10.8.2012]).

Muita menetelmiä DNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittämiseen on esimerkiksi agarosigeelielektroforeesi. Siinä DNA näytteet ajetaan sellaisenaan tai laimennettuina useaksi eri näytteeksi ja fluoresenssin voimakkuutta verrataan standardiin. Tämä menetelmä on helpompi kuin spektrofotometri, koska menetelmää eivät pienet epäpuhtaudet (RNA tai proteiinit) haittaa. Menetelmä ei ole kuitenkaan tarkka ja siinä pitää olla tarkasti suunniteltu standardinäyte, joka on suurin piirtein samankokoinen kuin näyte. (26)

6 POLYMERAASIKETJUREAKTIO

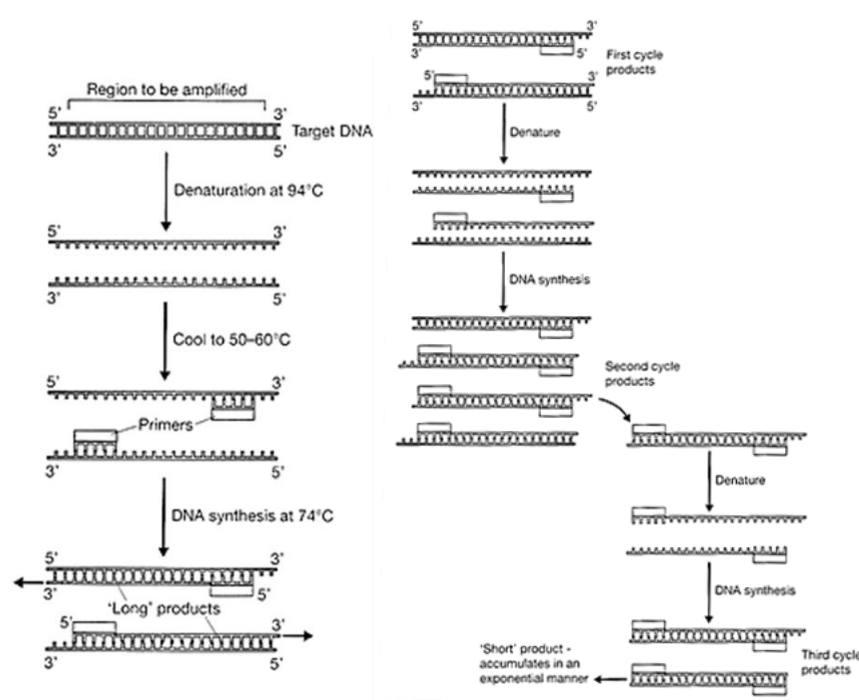
Polymeraasiketjureaktiossa, PCR, monistetaan tiettyä DNA -jaksoa. PCR:ssä voidaan monistaa suoraan DNA – jaksoja tai siihen voidaan käyttää komplementaarista DNA:ta. Monistettavaa DNA – jaksoa kutsutaan templaatiksi tai kohde - DNA:ksi. PCR:n avulla voidaan muun muassa selvittää DNA:n nukleotidijärjestys eli sekvensoida DNA tai sitä voidaan käyttää sairauksien toteamiseen, esimerkiksi perinnöllisiä sairauksia diagnosoidaan PCR:n avulla. (26, 28)

Monistettavan jakson aminohappojärjestys täytyy tuntea jakson alusta ja lopusta. Näihin tunnettuihin jaksoihin suunnitellaan alukkeet, primerit, jotka kiinnittyvät kaksinauhaisen DNA:n eri juosteisiin, monistettavan jakson alku- ja loppukohtiin. Yleensä monistettava alue on lyhyt, alle 10 kb. Monistettavaa DNA:ta ei tarvitse olla määrällisesti paljoa, koska PCR:ssä monistettavan jakson määrä nousee eksponentiaalisesti. (26, 28)

6.1 PCR:n periaate

Polymeraasiketjureaktion periaate on kuvattu kuvassa 5. Reaktio alkaa kuumennuskäsittelyllä. Lämpötilaa nostetaan korkealle, yli 90 °C, jotta kaksijuosteinen DNA tai cDNA eli kohde - DNA, denaturoituu ja alukkeet pystyvät kiinnittymään siihen. Denaturoinnin aikana kuumennus saa aikaan vetysidoksien katkeamisen kaksijuosteisen nauhan väliltä. Syntyy yksinauhaista DNA juostetta, johon alukkeet pystyvät kiinnittymään. Tätä seuraa lyhyt annealing -vaihe, jossa lämpötilaa lasketaan 50 – 60 °C:een. Tässä vaiheessa alukkeet kiinnittyvät, mutta itse kohde - DNA ei ehdi muuttumaan takaisin kaksinauhaiseksi. Alukkeet kiinnittyvät yksinauhaisen DNA:n vastinkohtaan. Tämän vaiheen lämpötila riippuu alukkeista: pituudesta, nukleotidikoostumuksesta ja pitoisuudesta. Lyhyen annealing -vaiheen jälkeen lämpötila nostetaan noin 72 °C. Pidennysreaktiossa reaktioseoksessa olevat

nukleotidit alkavat kiinnittyä alukseen 3' – päästä kohde - DNA:n mallin mukaisesti. Reaktioseoksen polymeraasi on pidennysreaktion tärkein ainesosa. Ilman sitä nukleotidit eivät aloita kiinnittymistä. Käytetyin polymeraasi on Taq-polymeraasi. Reaktiossa kummallekin nauhalle syntyy vastinnauha. Tämän jälkeen sykli alkaa uudelleen lämpötilan nostamisella yli 90 °C. (26, 28)



Kuva 5. PCR:n periaate: tuotteen monistuminen kolmessa ensimmäisessä syklissä (28:148 -149).

Kuvassa vasemmalla puolella on PCR:n 1. sykli ja oikealla 2. ja 3. sykli.

Denaturointi- annealing – pidennys – sykliä toistetaan yleensä 15–40 kertaa (28). PCR tuotteen määrä kasvaa eksponentiaalisesti syklien välillä. PCR:n reaktioseos sisältää kohde - DNA:n lisäksi muun muassa sopivaa puskuriliuosta, ylimäärin nukleotidejä (dNTP) ja alukkeita, lämpökestävää polymeraasientsyymiä sekä kationeita. (26, 28)

PCR – tuote voidaan analysoida esimerkiksi agaroosigeelielektroforeesilla. Tosin tätä ei tarvitse tehdä käytettäessä värileimaa, jossa tuotteen tunnistaminen tapahtuu sulamiskäyrän avulla. PCR - tuotetta voidaan puhdistaa

tarvittaessa esimerkiksi kaupallisilla puhdistuskiteillä. Puhdistustarve riippuu PCR - tuotteen jatkokäytöstä. (26, 28)

PCR:ää ajettaessa kannattaa näytteiden lisäksi ajaa ainakin negatiivinen kontrollinäyte, joka näyttää onko tapahtunut kontaminaatiota eli onko näytteissä epäpuhtauksia. Negatiivinen kontrollinäyte voi tarkoittaa, että kontrollinäytteessä ei ole ollenkaan DNA:ta; ainoastaan alukkeet, polymeraasi, nukleotidit ja leima. Jos monistettava DNA puuttuu, kontrollinäytteissä ei pitäisi monistua mitään. Negatiivinen kontrolli voi myös tarkoittaa näytettä, jossa on kaikki muut, mutta ei alukkeita, jolloin nukleotidien ei pitäisi kiinnittyä juosteisiin. Jos mahdollista, PCR:ssä olisi hyvä käyttää myös positiivista kontrollia eli näytettä, jossa tiedetään varmasti olevan kohde - DNA:ta. (26)

6.2 Kohde - DNA

Polymeraasiketjureaktiossa käytetään monistettavana kohteena joko komplementaarista DNA:ta (cDNA) tai genomista DNA:ta. (26)

Genominen DNA voidaan käyttää sellaisenaan PCR - ajossa, kunhan se on tarpeeksi puhdasta. cDNA:n lähtöaine on puolestaan RNA. Ensimmäiseksi RNA:sta valmistetaan käänteistranskriptiolla yksijuosteista cDNA:ta. Kun on saatu yksijuosteista cDNA:ta, se tulee vielä tehdä kaksijuosteiseksi, ennen kuin PCR ajo voidaan suorittaa. (26) cDNA:n valmistamiseen on olemassa kaupallisia kittejä, joissa on kaikki tarvittavat ainesosat mukana.

Tässä tutkimuksessa käytettiin suurimmaksi osaksi genomista DNA:ta, mutta myös cDNA:ta.

6.3 Polymeraasiketjureaktiota haittaavat (inhiboivat) asiat

PCR on erittäin herkkä menetelmä, jota haittaa monet eri asiat. Aluksi on varmistuttava, että kohde - DNA:ta on tarpeeksi paljon, alukkeiden pitoisuus liuoksessa on oikea ja että alukkeet ovat hyvin suunnitellut (tarkemmin luvussa

6.4.2) ja olosuhteet oikeat. On myös huomioitava, että hyvästä suunnittelusta huolimatta leimat ja pidennysreaktiossa käytetty polymeraasi voivat tehdä virheitä. (26, 31)

PCR:ää estävät asiat, eli inhibiittorit, voidaan jakaa kolmeen eri ryhmään. Ensimmäisessä ryhmässä inhibiittorit sitoutuvat polymeraasiin estäen sen toiminnan eli käytännössä alukkeet eivät pysty kiinnittymään yksijuosteiseen DNA:han. Toisessa ryhmässä inhibiittorit ovat kiinni monistettavassa DNA:ssa, jolloin kohde - DNA:n monistuminen häiriintyy tai estyy kokonaan. Kolmannessa ryhmässä inhibiittorit vaikuttavat pidennysvaiheessa häiriten sitä. Inhibiittoreiden poisto onkin tärkeää, koska ne voivat myös vaikuttaa PCR:n tehokkuuteen muuttamalla C_T -arvoa tai vaikuttamalla reaaliaikaisen PCR:n sulamiskäyrään. (32) Inhibiittoreina voivat olla esimerkiksi "väärä" DNA (ei-kohteena oleva), orgaaniset aineet, proteiinit ja etanoli. (31)

6.4 Kvantitatiivinen reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio

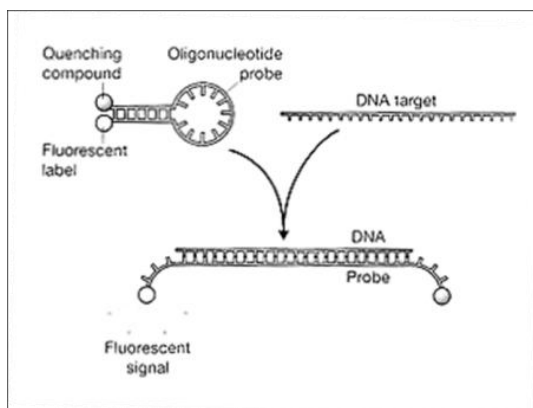
Kvantitatiivisessa reaaliaikaisessa polymeraasiketjureaktiossa (real time qPCR) saadaan seurattua tuotteen muodostumista reaaliaikaisesti. Menetelmä laskee lisäksi näytteiden DNA:n alkukonsentraatiot, kun ajossa ovat mukana standardit, joiden DNA - pitoisuus on tarkasti tunnettu. Tätä kutsutaan absoluuttiseksi kvantitointimenetelmäksi. Lisäksi voidaan käyttää suhteellista kvantitointimenetelmää, jossa DNA - pitoisuuksien sijaan verrataan näytteiden kynnyssyklejä (C_T - arvoja) toisiinsa. Kynnyssykli tarkoittaa hetkeä jolloin signaali ylittää määrätyn arvon. (26, 27)

6.4.1 Signaali

Real time qPCR tarvitsee toimiakseen fluoresoivan koettimen tai väriaineen. Väriaine, esim. SYBR[®] green, sitoutuu PCR - seoksen kaksinauhaiseen DNA:han ja laite mittaa DNA:n kokonaismäärää jokaisen syklin jälkeen. Mitä enemmän seoksessa on DNA:ta, sitä voimakkaampi on värin antama signaali.

Haikkana on, että väriaine ei ole spesifinen, joten se mittaa kaikkea DNA:ta seoksessa, myös alukkeiden hiusneularakenteita. (26, 28)

Koettimet ovat puolestaan lyhyitä DNA - jaksoja. Ne sitoutuvat PCR - tuotteeseen eli monistettavaan PCR - jaksoon, jolloin alukkeiden hiusneularakenteista ei tule signaalia ollenkaan. Koettimien pitää olla komplementaarisia monistettavan kohde - DNA:n kanssa, joten ne täytyy suunnitella erikseen jokaiselle PCR tuotteelle. Jokainen koetin PCR seoksessa on leimattu. Yleisesti käytetty tekniikka on hairpin - tekniikka, joka on selitetty kuvassa 6. Koettimia on muun muassa Taqman (esimerkiksi Taqman ®, Applied Biosystems). Koettimia voidaan valmistaa myös itse, mutta tämä on hankalaa ja epävarmaa. (26, 28, 33)



Kuva 6. Hairpin koettimeen toiminta: fluoresoivan signaalin syntyminen (28: 160).

Hairpin koettimessa osa koettimista, kuvassa probe, on leimattu fluoresoivalla värillä (fluorescent label) ja osa sammuttajalla (quenching compound). Väri näkyy signaalina, kun nämä kaksi osaa ovat eri päissä kohde - DNA:ta. Jos värileimallinen ja sammuttajaosa ovat samassa päässä, esimerkiksi alukkeen hiusneularakenteessa, koettimet tarttuvat automaattisesti yhteen, eikä signaalia synny. (26, 28)

6.4.2 Alukkeet

Alukkeiden eli primerien suunnittelu on tärkeää PCR:n onnistumisen kannalta. Niiden täytyy olla varmasti komplementaarisia kohde - DNA:n kanssa. Muuten ei monistusta tapahdu. Alukkeiden pituus on erityisen tärkeää. Liian lyhyt aluke saattaa kiinnittyä väärään paikkaan. Kiinnittymistä väärään kohde - DNA:n paikkaan saattaa aiheutua myös, jos seoksessa on liian paljon alukkeita. (26, 28)

Alukkeita suunniteltaessa apuna voi käyttää Internetistä löytyviä alukkeiden suunnitteluohjelmia. Alukkeita suunniteltaessa pitää huomioida alukkeiden sulamispisteet, jotka eivät saa erota toisistaan yli 2 astetta. Lisäksi alukkeissa tulee huomioida alukkeiden taipumus sitoutua itsensä kanssa eli muodostaa hiusneularakenteita. Hiusneularakenteet heikentävät alukkeiden toimintaa. (26, 28)

6.4.3 Tulokset ja niiden analysointi

Perinteisessä PCR:ssä tulokset analysoidaan (puhtaus ja pitoisuus) ajamalla PCR tuotteet esimerkiksi agarosigeelielektroforeesissa. Sen sijaan reaaliaikaisessa PCR:ssä syntyvien tuotteiden määrää seurataan signaalien määrän avulla. Tuotteen muodostumista voidaan seurata jokaisen syklin jälkeen ajon aikana. Käytettäessä väriainetta, esimerkiksi SYBR[®] Greeniä, voidaan syntyneen tuotteen puhtaus tarkistaa sulamiskäyrästä. (26) Sulamiskäyrä kertoo missä lämpötilassa kohde - DNA:n jakso sulaa. Sulamispisteen tulisi olla yhtenäinen kaikilla saman kohde - DNA:n ja alukkeen omaavilla kuopilla. Sulamiskäyrän perusteella voidaan päätellä, onko ei-haluttua tuotetta monistunut ja, ovatko alukkeet tehneet hiusneularakenteita. Nämä näkyvät kuvaajasta ylimääräisinä piikkeinä. (34)

PCR - ajon tuloksia tarkasteltaessa on syytä kiinnittää huomiota muutamiin asioihin. Taulukossa 1 on asioita ja arvoja, jotka tulee huomioida tuloksia tarkasteltaessa. Taulukon asiat on kerätty lähteistä 35 ja 36.

Taulukko 1. PCR – tulosten kriittisiä kohtia.

Englanti	Suomi	Selitys
Amplification curve	monistuskäyrä	Kertoo kohde - DNA:n monistumisesta (fluoresenssi signaali vs. syklinumero). Vaiheet: eksponentiaalinen, lineaarinen ja plateau (tasanne).
Baseline	pohjalinja	monistuminen ennen monistuskäyrän alkamista. Ei isoja muutoksia fluoresenssi signaalissa.
Thershold (line)	kynnysarvo	tulee olla monistumisen eksponentiaalisessa vaiheessa
Thershold cycle (C_T)	kynnyssykli	sykli, jossa näytteen signaali ylittää kynnysarvon
Standard deviation C_T	keskihajonta C _T	poikkeamat rinnakkaisten näytteiden C _T arvoissa (poikkeamat yksittäisen näytteen ja keskiarvon välillä)
R²	R ² -arvo	kertoo kuinka täsmällisesti tietyn näytteen (esim. standardisuoran) C _T – arvosta voidaan ennustaa toisen näytteen arvo (esim. pitoisuus)
Slope	kulmakerroin	Jos kulmakerroin on -3,3, tehokkuus on 100 %.
Efficiency	tehokkuus	monistumisen tehokkuus, lasketaan slope – arvosta. Teoreettisesti tulisi olla 100 %, jolloin tuote kaksinkertaistuu jokaisessa syklissä.

Taulukon arvoihin on määrätty raja-arvot, paitsi kynnysarvolle, joka on PCR - ajokohtainen. Tehokkuuden tulisi olla 90 – 100 % välillä (35), mikä tarkoittaa, että kulmakertoimen tulisi olla -3,12 – -3,6, jolloin tehokkuus on välillä 109,12 - 89,57 (37 [viitattu 7.8.2012]). R² voi olla parhaimmillaan tasan 1, jolloin voidaan täsmällisesti ennustaa arvosta X arvo Y. Luotettava tulos voidaan laskea, kun R² – arvo on yli 0,99 (36). Arvojen lisäksi monistuskäyristä tulee tarkistaa, että

niiden muoto on samanlainen eri näytteiden välillä, että niistä löytyy kaikki eri vaiheet. Lisäksi tulee tarkistaa, että pohjalinja on oikeassa paikassa ja kynnysarvo on ekapotentiaalisessa kohdassa. (35, 36)

6.4.4 PCR menetelmät

Reaaliaikaisessa qPCR:ssä voidaan käyttää kahta eri menetelmää: suhteellista tai absoluuttista menetelmää. Absoluuttisessa menetelmässä käytetään hyväksi standardisuorakuvaajaa. Standardisuoran C_T arvojen perusteella PCR – ohjelma laskee näytteistä pitoisuuden tms. absoluuttisen mittayksikön omaavan arvon. Absoluuttisessa menetelmässä täytyy kuitenkin tietää miten pohjalinjaa ja kynnysarvoa säädetään, koska molemmat vaikuttavat C_T -arvoihin ja sitä kautta näytteiden pitoisuuksiin. Standardisuoran tulee olla hyvin suunniteltu ja siinä tulee olla vähintään 5 eri pistettä. (38)

Absoluuttista menetelmää yleisempi menetelmä on suhteellinen menetelmä. Siinä verrataan eri näytteiden arvoja toisiinsa, esimerkiksi C_T – arvoja. (26) Suhteellisessa menetelmässä halutaan siis tietää näytteiden suhteelliset erot. Suhteellisia menetelmiä on kaksi, toisessa tarvitaan standardisuoraa (Relative Standard Curve -method), toisessa ei (Compare C_T -method, $\Delta\Delta C_T$). Menetelmät eroavat toisistaan jonkin verran. Standardisuora menetelmässä lasketaan näytteiden pitoisuuserot ja $\Delta\Delta C_T$ – menetelmässä verrataan C_T – arvoja. Lisäksi laskutavoissa on eroja. Standardisuoraan perustuvassa menetelmässä täytyy huomioida samoja asioista, mitä absoluuttisessa menetelmässä. (38, 39) Tässä tutkimuksessa käytettiin pääsääntöisesti standardisuoraan perustuvaa suhteellista menetelmää.

Näytteiden DNA – pitoisuuksissa voi olla eroja eri näytteiden välillä, jotka täytyy huomioida laskettaessa suhteellisia eroja. Erot huomioidaan normalisoimalla näytteet endogeenisellä standardigeenillä eli niin sanotulla housekeeping geenillä, jolloin näytteiden eri pitoisuuksista johtuvat erot tasoittuvat. (40) Standardisuoraan perustuvassa suhteellisessa menetelmässä näyte jaetaan

endogeenisella geenillä ja $\Delta\Delta C_T$ – menetelmässä näytteestä vähennetään endogeeninen geeni. (39)

7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Luvussa käydään läpi näytteiden kerääminen, DNA:n eristäminen ja puhdistus, DNA pitoisuuden määrittäminen ja puhtaus, polymeerasiketjureaktioajat sekä tulosten laskeminen.

7.1 Hiiret

Tutkimukseen käytettiin 4 erilaista hiirtä: α_{2A} – KO - ja α_{2AC} - KO – hiiriä, neuropeptidi Y hiiriä sekä laboratoriohiiriä (C57B/6J, ”villityyppi”). Taulukossa 2 on hiirien lukumäärät.

Taulukko 2. Tutkimuksessa käytettyjen hiirien lukumäärät tyyteittäin.

Hiirityyppi	Naaraat (kpl)	Urokset (kpl)
α_{2A} knockout	7 (2:sta ei näytteitä)	11
α_{2AC} knockout	8 (1:stä ei näytteitä)	8
Neuropeptidi Y	-	7
Villityyppi (α_2)	9	9
Villityyppi (NPY)	-	5

NPY hiiret ja näiden verrokkiryhmän villityyppihiiret eivät saaneet tutkimuksen aikana mitään erikoista käsittelyä, vaan ne elivät normaaleissa olosuhteissa syöden normaalia ruokaa. Tutkimuksessa käytettiin näytteinä näiden hiirien ruskeaa rasvaa. Näytteet jäädettiin oton jälkeen nestemäisessä työssä ja säilytettiin -70 °C.

α_2 – KO -hiiret sen sijaan elivät ennen näytteiden ottoa kolme viikkoa HFD - ruokavaliolla. Hiiret saivat syödä ruokaa rajattomasti. Kaikki hiiret elivät omissa häkeissään. Osa hiiristä laitettiin paastolle vajaa vuorokausi ennen lopetusta. Lyhyt paastoaminen ei kuitenkaan vaikuta mitokondriaaliseen DNA:n määrään tai laatuun. Ennen lopetusta hiiret punnittiin.

Tutkimusta varten NPY - hiiristä otettiin näytteet ruskeasta rasvasta. α_2 – KO - hiiristä otettiin kolme erilaista näytettä: yksi näyte ruskeasta rasvasta eli brown adipose tissue, BAT, ja kaksi näytettä valkoisesta rasvasta, white adipose tissue, WAT. Toinen WAT - näyte otettiin ihonalaisesta rasvasta ja toinen munuaisten ympärillä olevasta rasvasta. Näytteet jäädytettiin heti oton jälkeen nestemäisessä työssä ja niitä säilytettiin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Koska ihonalainen rasva ja munuaisten ympärillä oleva rasva on samanlaista, tutkimuksessa käytettiin ainoastaan ihonalaisesta rasvasta peräisin olevat WAT - näytteet.

Kaikista hiiristä saaduista rasvanäytteistä eristettiin DNA. Tämän lisäksi tutkimuksessa käytettiin NPY - hiirien ruskeasta rasvasta eristettyä RNA:ta. RNA saatiin valmiiksi eristettynä.

7.2 DNA:n eristys kaupallisella kitillä

Näytteistä leikattiin noin 20 mg painavia kudospätkiä. Ruskean rasvan näytteistä poistettiin leikkaamalla kaikki näkyvä valkoinen rasva. Näytteet punnittiin analyysivaa'alla (AE 100, Mettler).

DNA:n eristys tapahtui Qiagenin Gentra puregene tissue – kitillä (Puregene ® Kit A, Qiagen). Kitti sisälsi Cell lysis –liuoksen soluhajotukseen, Proteinaasi K – liuoksen (Puregene ® proteinase K), RNAasi – liuoksen (RNase A solution) ja proteiinin saostusliuoksen (Protein precipitation solution) sekä DNA:n liuottamiseen tarvittavan liuoksen (DNA hydration solution). Liuosten koostumuksia ei ole saatavilla Qiagenin sivuilta. Lisäksi tutkimuksessa käytettiin isopropanolia (2-propanol, J.T. Baker) DNA:n saostukseen ja 70 % etanolia DNA:n pesemistä varten. (41)

Qiagenin ohjeen mukaan kudoksenäytteiden olisi pitänyt olla 5-10 mg painoisia, mutta kokeilujen perusteella kudoksenäytteen painoksi valittiin 20 mg. Etenkin WAT - näytteistä ei 5-10 mg:aa näytettä riittänyt, koska tällöin DNA:ta ei eristynyt ollenkaan. Koska kudoksenäytteet olivat suurempia kuin ohjeessa, myös Proteinaasi K:n ja RNAasin määrää BAT – näytteiden hajottamiseen nostettiin 1,5 µl:sta 3,0 µl:aan ja vastaavasti WAT – näytteiden hajotukseen 1,5 µl:sta 2,5 µl:aan. Soluhajotus liuokseen lisättiin siis Proteinaasi K:ta BAT - näytteisiin 3,0 µl ja 2,5 µl WAT – näytteisiin. Kudoksenäytteiden annettiin olla liuoksessa yön yli vesihauteessa +55 °C. Tämän jälkeen liuokseen lisättiin RNAasia BAT - näytteisiin 3,0 µl ja 2,5 µl WAT – näytteisiin. Liuos oli vielä yhden tunnin ajan kuivahauteessa +37 °C asteessa.

Kun kudoksenäytteet olivat hajonneet, liuokset jäähdytettiin nopeasti noin yhden minuutin ajan jäähauteessa. Jäähdytyneisiin liuoksiin lisättiin proteiinin saostusliuosta ohjeen mukaisesti ja liuoksista erotettiin saostuneet proteiinit sentrifugi - laitteella (Eppendorf centrifuge 5415C). Qiagenin ohjeen mukaan näytteet olivat sentrifugissa 3 minuuttia kierrosnopeuden ollessa 14 800 G.

Sentrifugi ajon jälkeen supernatantti, eli sentrifugissa erottunut liuos, pipetoitiin 300 µl:aan isopropanolia, jolla saostettiin DNA. Saostunut DNA erotettiin sentrifugilla. Qiagenin ohjeen mukaisti tähän vaiheeseen olisi riittänyt 1 minuutin sentrifugi ajo, mutta kokeilujen perusteella aika nostettiin 3 minuuttiin, kierrosnopeus oli 14 800 G.

Saostunut DNA pelletti pestiin tämän jälkeen 70 % etanolilla. Jälleen saostunut DNA erotettiin etanolista sentrifugilla. Tässäkin vaiheessa aikaa nostettiin Qiagenin ohjeen mukaisesta 1 minuutista 3 minuuttiin, kierrosnopeus oli 14 800 G. Erottunut liuos poistettiin varovasti neulan ja ruiskun avulla, ja saostuneen DNA pelletin annettiin ilmakeivua viiden minuutin ajan. Lopuksi tarkistettiin silmämääräisesti, ettei putkissa ole enää pisaroita, ja putkeen lisättiin ohjeen mukaan DNA:an liuottamiseen tarkoitettua liuosta. Liuoksen annettiin seistä yhden tunnin ajan vesihauteessa +65 °C, jonka jälkeen DNA pakastettiin -20 °C asteessa.

Tähän tutkimukseen ei kuulunut RNA:n eristäminen vaan RNA näytteet saatiin valmiiksi eristettynä.

7.3 DNA:n puhtaus ja laimennokset

DNA:n eristuksen jälkeen, DNA – liuoksesta tarkistettiin pitoisuus ja puhtaus BioSpec – nano -laitteella (BioSpec – nano, Shimadzu). BioSpec – nano -laite mittaa 1,0 µl:sta näytettä pitoisuuksia 50 – 3700 ng/µl väliltä ja 2,0 µl:sta näytettä 15 – 1000 ng/µl. Lisäksi laite mittaa näytettä nanometreillä 260, 280, 230 ja 320. Laitteen ohjelma laskee myös suhdeluvun A_{260}/A_{280} ja A_{260}/A_{230} sekä näytteen konsentraation. (42) BAT - näytteistä eristetty DNA mitattiin 1,0 µl:n näytteestä ja WAT - näytteistä eristetty DNA 2,0 µl:n näytteestä.

DNA pitoisuuden ja puhtauden mittauksen jälkeen näytteet laimennettiin loppupitoisuuteen 5 ng/µl. Laimennukseen käytettiin nukleasivapaata vettä (Nuclease-free water, Qiagen).

7.4 PCR

PCR - ajoissa näytteet pipetoitiin 96-kuoppalevylle siten, että aina yhden linjan naaraat/urokset olivat samalla levyllä. Kuoppalevyllä käytettiin vain yhtä aluketta kerrallaan. Näytteiden lisäksi kaikki kuoppalevyt sisälsivät myös standardinäytteet. PCR - laitteena oli monikanavainen Real time PCR system, Applied Biosystem.

PCR -ajossa käytettiin SYBR[®] Greeniä (KAPA SYBR[®] FAST qPCR kit, KAPA Biosystems). KAPA SYBR[®] sisältää Taq – polymeraasin. Taulukossa 3 on ajo-olosuhteet.

Näytteet valmistettiin KAPA Greenin ohjeen mukaisesti. Näytepitoisuudeksi valittiin 10 ng/µl/kuoppa, joten näytettä pipetoitiin kuopalle 2 µl. Näytteet sekoitettiin PCR – liuokseen, joka sisälsi nukleasivapaata vettä, KAPA SYBR[®] FAST qPCR Master Mix (2x) ja BIO-rad iCycler[™] (1x) sekä eteenpäin aluketta

200 nM ja taaksepäin aluketta 200 nM. Yhdelle kuopalle pipetoitiin liuosta yhteensä 18 µl. Jokaisesta näytteestä pipetoitiin kolme rinnakkaista.

Standardisuoraksi valittiin 5 pistettä. Aluksi kokeiltiin pisteitä 200 ng/µl, 20 ng/µl, 2 ng/µl, 0,2 ng/µl ja 0,02 ng/µl. Väkevin laimennus ei toiminut PCR:ssä, joten seuraavaksi kokeiltiin 100 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl, 0,1 ng/µl ja 0,01 ng/µl. Laimennukset toimivat kokeilussa hyvin, joten nämä valittiin standardisuoran pisteiksi. Standardinäytteet saatiin villityyppihiiristä, jotka eivät olleet HFD - dieetillä.

Näytteitä pipetoitaessa käytettiin filttareilla varustettua pipetinkärkiä. Kaikki pipetointi tapahtui laminaarikaapeissa. PCR – liuoksen pipetointi tapahtui omassa huoneessa.

Taulukko 3. PCR ajo-olosuhteet (43, 44).

Vaihe	Lämpötila (° C)	kesto	Sykli lkm
Entsyimin aktivoiminen	95	3 min	pito
Denaturointi	95	3 sek	40
Anneling/pidennys	60	30 sek	
Sulamiskäyrä	95	15 sek	1
	60	1 min	
	95	15 sek	
	60	15 sek	

Alukkeina käytettiin taulukon 4 alukkeita. Kaikki alukkeet ovat Oligomeerin.

Taulukko 4. Tutkimuksessa käytetyt alukkeet.

Geenin nimi	geeni	alukkeet
Cytochrome B	CYT B	F:5'-CAT TTA TTA TCG CGG CCC TA -3' R:5'-TGG GTT GTT TGA TCC TGT TTC -3'
NADH hydrogenaasi 2	NADH 2	F:5'-CCA TCA ACT CAA TCT CAC TTC TCT G -3' R:5'-GAA TCC TGT TAG TGG TGG AAG G -3'
Uncoupling protein 1 (ainoastaan RNA näytteille)	UCP-1	F:5'-GGC CTC TAC GAC TCA GTC CA-3' R:5'-TAA GCC GGC TGA GAT CTT GT-3'
S29 ribosomal protein	(RP)S29	F:5'-AGC CTA TGT CCT TCG CGT ACT -3' R:5'-ATG GGT CAC CAG CAG CTC TA -3'

PCR – menetelmäksi valittiin suhteellinen menetelmä; DNA -näytteille Relative Standard Curve – menetelmä ja RNA – näytteille $\Delta\Delta C_T$. Puhtaus tarkistettiin sulamiskäyrästä. PCR – ajon jälkeen tuotteeseen ei tehty enää lisäanalyyseja.

Relative Standard Curve - ja $\Delta\Delta C_T$ – menetelmän laskut ovat otettu lähteestä 39. Relative Standard Curve – menetelmässä laskettiin ensiksi rinnakkaisnäytteiden pitoisuuksista keskiarvot ja ne normalisoitiin, eli geenien CYT B ja NADH 2 rinnakkaisten pitoisuuksien keskiarvot jaettiin samojen näytteiden S29 geenin keskiarvolla. Normalisointi tehtiin kaikille näytteille. Tämän jälkeen geeninmuunnelluista hiiristä saatujen näytteiden normalisoidut pitoisuudet jaettiin villityyppien normalisoitujen pitoisuuksien keskiarvolla. Seuraavaksi villityyppien keskiarvolla jaettiin myös jokainen villityypin normalisoitu pitoisuus. Saatuja tuloksia verrattiin toisiinsa. Taulukossa 5 on esimerkki yhdestä laskusta.

Taulukko 5. DNA näytteiden lasku: α_{2A} – KO uroksen CYT B geeni verrattuna villityyppiin.

	S29	KA	CYT B	KA	CYT B/S29	FOLD: (CYT B/S29)/ WT KA(CYT B/S29)
BAT A-1 (13)	10,9919	10,9161	8,2766	8,3557	0,7654	0,948614059
	12,202		8,4347			
	9,5544					

RNA näytteiden $\Delta\Delta C_T$ – menetelmässä tuloksia verrattiin samalla lailla: geenimuunnellut hiiret verrattuna villityyppiin, mutta menetelmässä ei käytetty standardisuoraa, vaan verrattavat arvot olivat C_T – arvoja. Lisäksi jakamisen sijaan laskuissa käytettiin vähennyslaskuja. Ensimmäiseksi geenien rinnakkaisista C_T – arvoista laskettiin keskiarvot, jotka normalisoitiin S29 arvoilla. Tämä tapahtui vähentämällä kohteena olevasta geenistä S29 geenin arvo ($=\Delta C_T$). Tästä arvosta puolestaan vähennettiin villityyppien vastaavien arvojen keskiarvo ($\Delta\Delta C_T$). Lopullinen tulos laskettiin kaavalla $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$. Taulukossa 6 on esimerkkilasku.

Taulukko 6. RNA näytteiden lasku: NPY hiiren CYT B geeni verrattuna villityyppiin.

	CYT B	KA	s29	KA	dCt (CYT B - S29)	ddCt ((CYT B - S29) - WT (CYT B - S29) KA)	Tulos
NPY 1	14,3664	14,36567	18,7947	18,5726	-4,206933333	0,097193333	0,93485
NPY 1	14,3412		18,8145				
NPY 1	14,3894		18,1086				

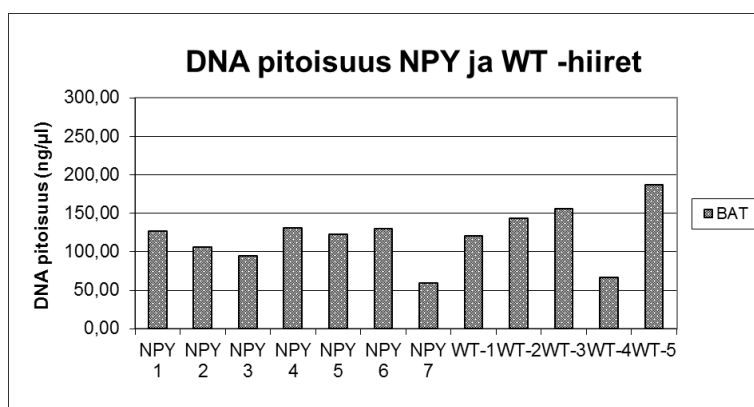
Kaikille eri hiirityypeille, myös villityypeille, tehtiin kyseiset laskut. Lopuksi tuloksista piirrettiin kuvaajat, joissa verrattiin geenimuunneltuja hiiriä villityyppiin. Laskut laskettiin Microsoft Excel –ohjelmalla.

8 TULOKSET JA POHDINTA

Tutkimuksessa haluttiin selvittää oliko mitokondriaalisessa DNA:ssa muutoksia geenimuunneltujen ja villityyppihiirien välillä.

8.1 DNA eristystulokset

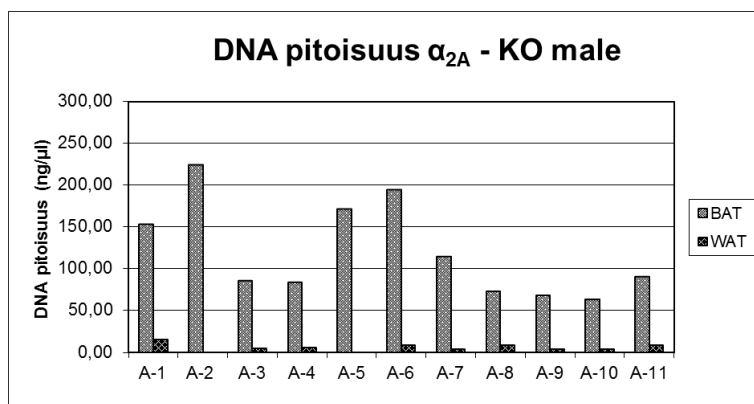
Kuvaajassa 1 on NPY- ja villityyppi – hiirien ruskeasta rasvakudoksista, BAT-näytteistä, eristetyt DNA - pitoisuudet. Kuten kuvaajasta näkee, eristyminen onnistui muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta. Kaikkien DNA – pitoisuudet olivat melkein samat. Pienet erot selittyvät kudoksenäytteiden eri alkumäärillä. Kuvaajassa NPY – lyhenne tarkoittaa NPY – hiirtä ja WT on villityyppi.



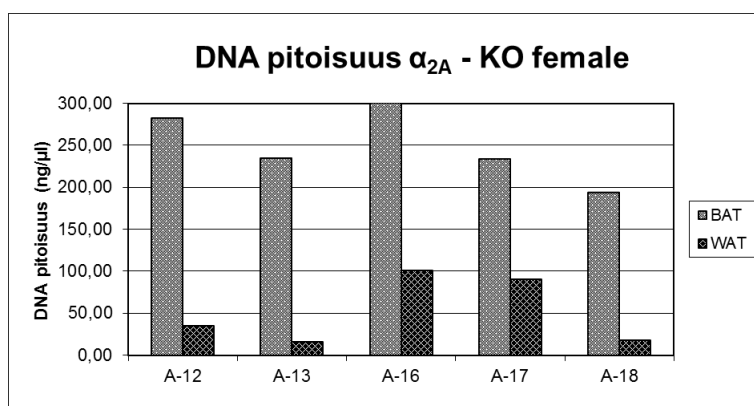
Kuvaaja 1. DNA - pitoisuus NPY ja villityyppi: BAT.

Kuvaajissa 2 ja 3 on esitetty α_{2A} – KO – hiirien DNA eristykset BAT - näytteistä ja valkoisesta rasvakudoksesta eli WAT - näytteistä. Kuvaajista voidaan nähdä, että BAT - näytteistä DNA:n eristys onnistui hyvin, etenkin naaraissa, mutta WAT - näytteistä eristys ei onnistunut. Varsinkin uroksissa oli WAT - näytteiden DNA - pitoisuudet hyvin alaiset. Naaraissa eristys WAT - näytteistä onnistui vähän paremmin. Kuitenkin pitoisuudet olivat niin alaiset, että osa WAT - näytteistä eristetyistä DNA:sta jätettiin pois PCR – ajoista. Eristystuloksissa voi olla myös virheitä, koska BioSpec – nano – laite mittasi välillä 15 – 1500 ng/μl.

Osa tuloksista oli laitteen mittaaman alarajan alapuolella. Tästä huolimatta joitakin näytteitä otettiin kuitenkin PCR - ajoihin mukaan.



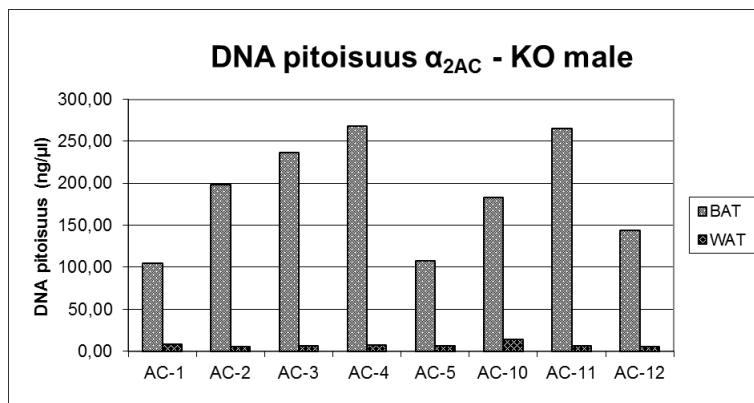
Kuvaaja 2. DNA - pitoisuus α_{2A} – KO uros: ruskea (BAT) ja valkoinen (WAT) rasva.



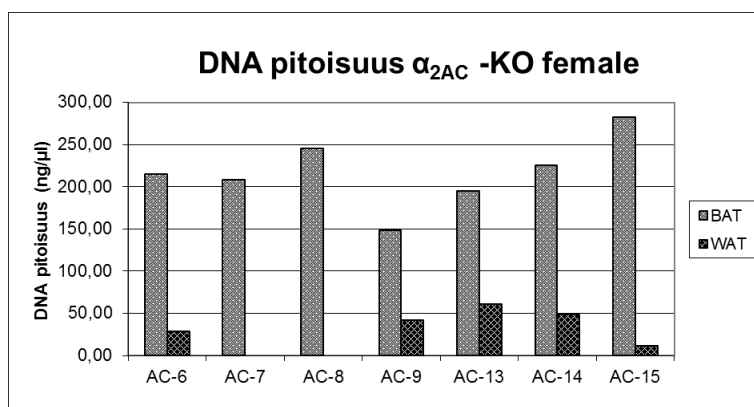
Kuvaaja 3. DNA - pitoisuus α_{2A} – KO naaras: ruskea (BAT) ja valkoinen (WAT) rasva.

Kuvaajissa 4 ja 5 on α_{2AC} – KO – hiirien kudoksista eristetty DNA – pitoisuudet. α_{2AC} – KO – naaraista kaksi WAT - näytettä jätettiin pois jo ennen DNA eristystä. Poisjätetyt näytteet eivät olleet käyttökelpoisia.

Kuvaajien perusteella eristys onnistui BAT - näytteistä, mutta ei WAT - näytteistä. Jälleen, etenkin uroshiiristä saaduista WAT – näytteistä, oli suuria ongelmia. Tämän takia näistäkin näytteistä jätettiin muutama pois jatkosta.

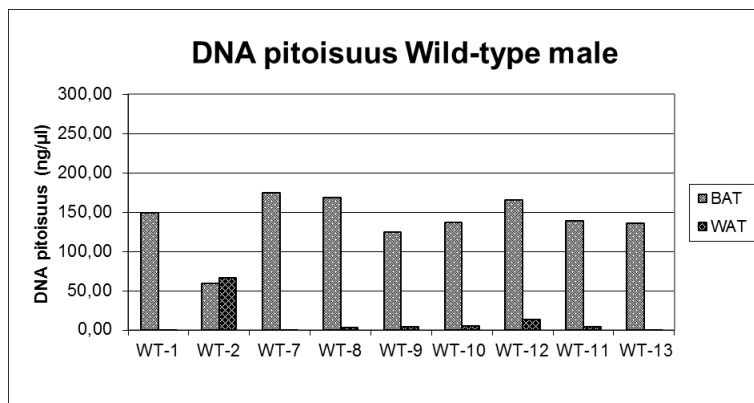


Kuvaaja 4. DNA - pitoisuus α₂AC – KO uros: ruskea (BAT) ja valkoinen (WAT) rasva.

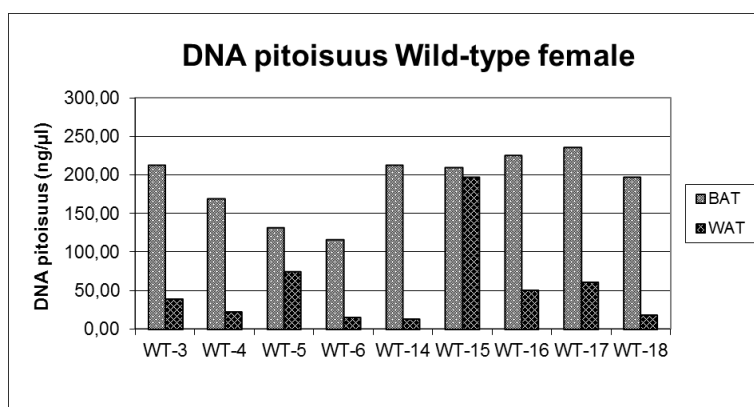


Kuvaaja 5. DNA - pitoisuus α₂AC – KO naaras: ruskea (BAT) ja valkoinen (WAT) rasva.

Kuvaajissa 6 ja 7 on villityyppien DNA - eristystulokset. Jälleen kohdattiin sama ongelma kuin aiemmin, BAT - näytteistä eristykset onnistuivat, mutta WAT - näytteistä eivät. Toisaalta WAT - näytteistä onnistuttiin eristämään muutaman kerran kunnolla DNA:ta. Kuvaajista nähdään, että WT-2 kuvaajassa 6 onnistui, samoin WT-5, WT-15 – WT -17 kuvaajassa 7.



Kuvaaja 6. DNA - pitoisuus villityyppi uros: ruskea (BAT) ja valkoinen (WAT) rasva.



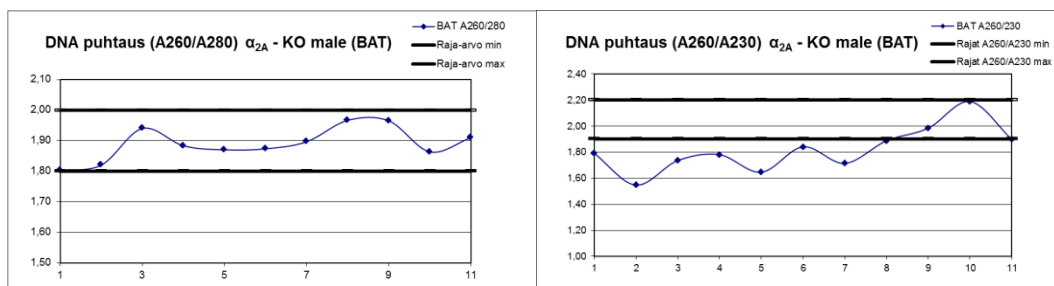
Kuvaaja 7. DNA - pitoisuus villityyppi naaras: ruskea (BAT) ja valkoinen (WAT) rasva.

Sytä, miksi eristys ei onnistunut WAT - näytteistä, on monia. Suurimpana syynä on mitokondrioiden ja DNA:n vähäisyys rasvakudoksessa. Etenkin mitokondrioita on paljon vähemmän valkoisessa rasvassa kuin ruskeassa rasvassa (8). Lisäksi näytteet painoivat noin 20 mg, joka on suhteellisen pieni määrä verrattuna etenkin uroshiirien rasvan kokonaispainoon.

Eristystä saattoi häiritä näytteiden sisältämä rasva. Tulevaisuudessa on hyvä miettiä, voisiko eristykseen käyttää jotain muuta menetelmää tai kittiä. Esimerkiksi rasvan uuttamista ennen DNA - eristystä voisi miettiä. Näytteiden kokoa voisi myös suurentaa. Valkoisesta rasvasta saatiin hyviä eristystuloksia, kun näytteen määrä kaksinkertaistettiin. Toisaalta tutkimuksen pääkohteena oli

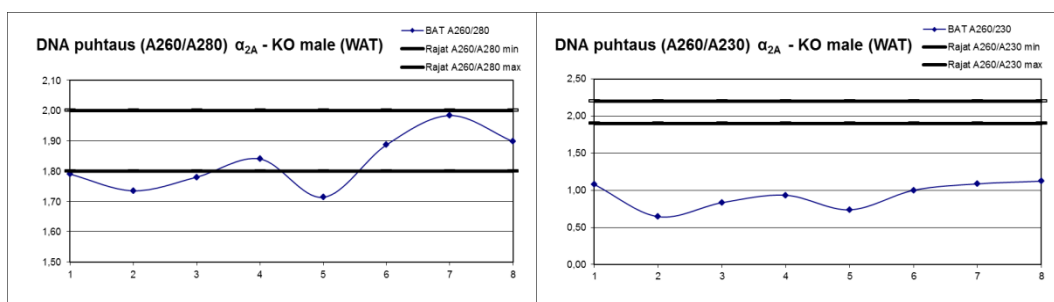
ruskean rasvan mitokondrioiden erot, joten päätutkimusta valkoisen rasvan DNA:n eristysongelmat eivät haitanneet.

Pitoisuuden lisäksi DNA:n puhtaus oli tärkeä asia. Kuvaajissa 8 ja 9 on α_{2A} – KO uroksista saatujen näytteiden A_{260}/A_{280} ja A_{260}/A_{230} – suhdeluvut (sininen viiva) ja näiden suhdelukujen raja-arvot (mustat viivat). DNA:n puhtautta käsiteltiin luvussa 5.1.2.



Kuvaaja 8. DNA:n puhtaus (A_{260}/A_{280} ja A_{260}/A_{230}) α_{2A} – KO uros, näyte ruskeasta rasvasta.

Suhdeluvun A_{260}/A_{280} perusteella DNA olisi puhdasta, mutta suhdeluku A_{260}/A_{230} olivat sekä BAT - että WAT - näytteissä liian matalat, muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta. Tämän perusteella voidaan olettaa, että näytteissä oli puhtaan DNA:n lisäksi jotain muutakin.

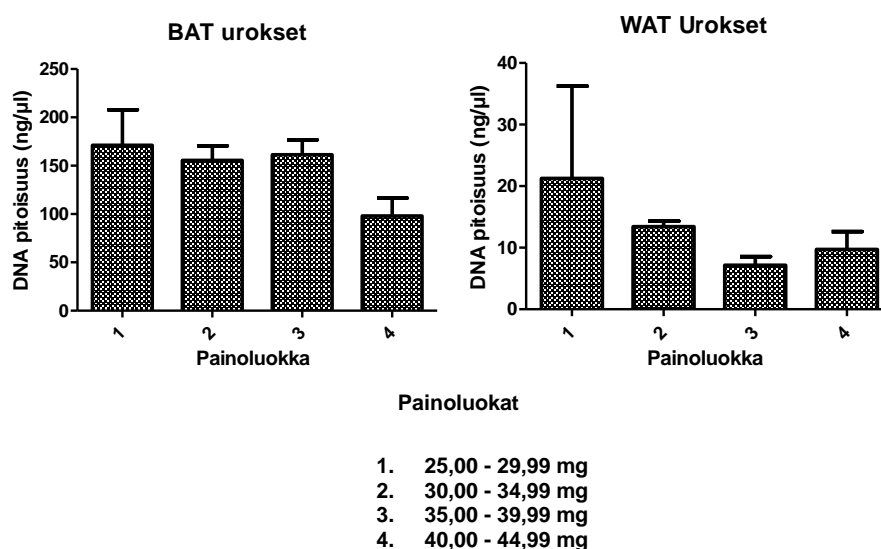


Kuvaaja 9. DNA:n puhtaus suhdeluku (A_{260}/A_{280} ja A_{260}/A_{230}) α_{2A} – KO uros, näyte valkoisesta rasvasta.

Puhtaudessa ei ollut juuri eroja BAT - ja WAT - näytteiden välillä. Muistakin hiirilinjoista eristetyn DNA:n puhtaus oli samanlaista kuin kuvaajissa 8 ja 9. Suhdeluku A_{260}/A_{280} oli raja-arvojen sisällä, mutta suhdeluku A_{260}/A_{230} liian

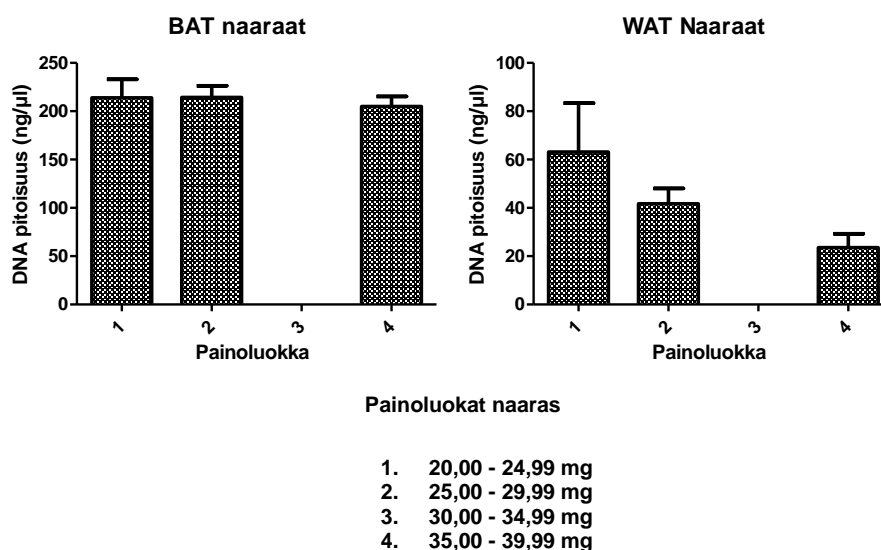
alhainen. NPY hiirien BAT - näytteistä eristetty RNA noudatti myös samaa kaavaa.

Koska WAT - näytteiden DNA - pitoisuudet olivat alhaiset, tutkittiin vielä kuvaajien avulla vaikuttiko hiirien painot DNA - eristykseen. Ajatuksena oli, että painavimmissa hiirissä olisi enemmän rasvaa, joka haittaa DNA - eristystä. Kuvaajissa on jaettu α_2 - KO - ja villityyppihiiret painon ja sukupuolen mukaan sekä onko näytteet peräisin BAT - vai WAT - näytteestä.



Kuvaaja 10. DNA – pitoisuudet painoluokittain α_2 - KO - uroksissa.

Kuvaajista 10 ja 11 voidaan huomata, että paino ei juuri vaikuttanut BAT - näytteissä DNA - eristykseen, mutta WAT - näytteissä DNA:n pitoisuus laski hiiren painon noustessa. Osittain myös uroshiirien BAT - näytteissä painon noustessa DNA pitoisuus laski. Samoin kuvaajista nähdään jo aikaisemmin todettu asia, BAT - näytteistä DNA:ta eristyi huomattavasti paremmin kuin WAT - näytteistä.



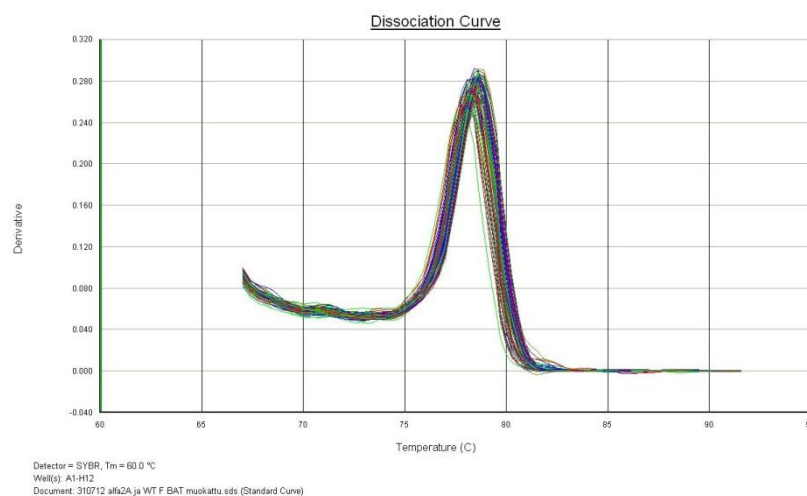
Kuvaaja 11. DNA – pitoisuudet painoluokittain α_2 – KO - naaraat.

Suoraa johtopäätöstä painon vaikutuksesta DNA:n eristykseen ei voida kuitenkaan tehdä, koska näytteet, joista DNA eristettiin, eivät olleet milligrammalleen samat. Lisäksi DNA:ta ei eristetty kaikista näytteistä samalla kertaa, joten eristyskerroissa voi olla pieniä eroja, vaikka samaa ohjetta noudatettiin jokaisella kerralla. Näytteitä oli myös lukumääräisesti vähän, vain alle 10 kpl/painoluokka, joten tarkempaa analyysia varten tulisi näytteiden lukumäärää kasvattaa.

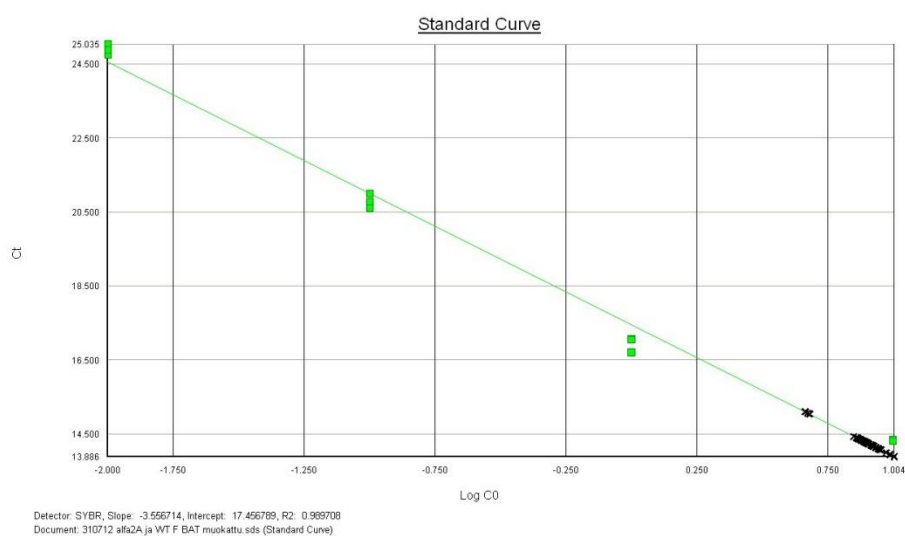
8.2 PCR - ajojen kuvat

PCR - ajoissa kiinnitettiin erityinen huomio muutamaan asiaan. Nämä olivat sulamiskäyrä, standardisuora ja kuvaaja kohde - DNA:n monistumisesta (amplification plot). Sulamiskäyrästä tarkistettiin, että kaikkien näytteiden sulamiskäyrät olivat samanlaiset, standardisuorasta katsottiin R^2 - arvoa, joka kertoi tulosten luotettavuudesta sekä slope - arvoa, joka kertoi monistuksen tehokkuudesta. Kohde - DNA monistuskuvaaajasta katsottiin, että kaikkien näytteiden monistuskäyrät olivat hyviä. Mitään tarkkoja rajoja ei tuloksille asetettu, vaan tulosten hyväksyminen oli kuoppalevykohtaista, johon vaikutti

kaikki edellä mainitut asiat. Kuvissa 7 ja 8 esimerkkikuvat sulamiskäyrästä ja standardisuorasta.



Kuva 7. Sulamiskäyrän samanmuotoisuus, alukkeena CYT B, näytteet α_{2A} – KO - ja villityyppi naaraat.



Kuva 8. CYT B alukkeen standardisuora, näytteet α_{2A} – KO - ja villityyppi naaraat.

Niin kuin kuvasta 8 voidaan nähdä, näytteiden arvot olivat aivan suoran alareunassa. Tämä johtui siitä, että väkevin standardi jouduttiin jättämään lopullisista tuloksista pois (100 ng/μl), koska sen C_T - arvot sekoittivat täysin

muut arvot. Ilmeisesti poisjätetyssä standardinäytteessä oli sen verran paljon enemmän monistettavaa DNA:ta, että eksponentiaalinen vaihe alkoi liian aikaisin verrattuna muihin.

Suurin ongelma PCR - ajoissa oli slope – arvo, joka oli liian alhainen melkein jokaisessa PCR - ajossa. Ajoihin onkin suurella todennäköisyydellä vaikuttanut DNA:n epäpuhtaus eli käytännössä aine, joka absorboitui 230 nm:ssä. Tämä vaikutti todennäköisesti slope – arvoon ja tätä kautta tehokkuuteen. Lisäksi tehokkuuteen vaikuttivat alukkeet, joista ei tiedetä olivatko ne parhaimmat näille näytteille.

Tutkimuksen kaikkien PCR – ajojen slope - arvo oli noin – 4, kun hyväksyttävä alaraja olisi -3,6. Vaikka tehokkuus ei ollut rajojen sisällä, tulokset hyväksyttiin, koska kaikissa eri ajojen tuloksissa oli suurin piirtein sama tehokkuus. Lopullisiin tuloksiin sen ei siis pitäisi vaikuttaa.

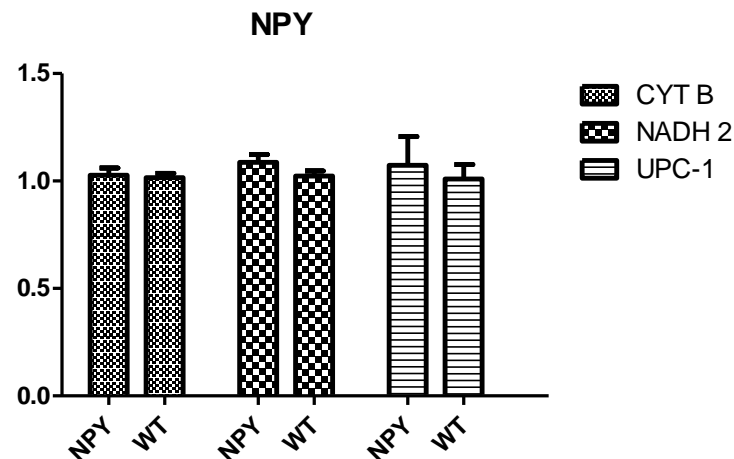
8.3 Mitokondriaalisen DNA:n määrän muutoksen

Tuloksissa verrattiin NPY - hiiriä villityyppiin (WT) sekä α_2 – KO – hiiriä villityyppeihin (WT). α_{2A} – ja α_{2AC} – KO – hiiriä ei verrattu keskenään. Tulokset on jaoteltu sukupuolen, geenien ja rasvakudoksen mukaan.

Mitokondriaalisen DNA:n määrän muutoksiin liittyvät laskut ja kaavat on esitetty luvussa 7.4. Tutkimuksessa käytetyt alukkeet ovat taulukossa 4.

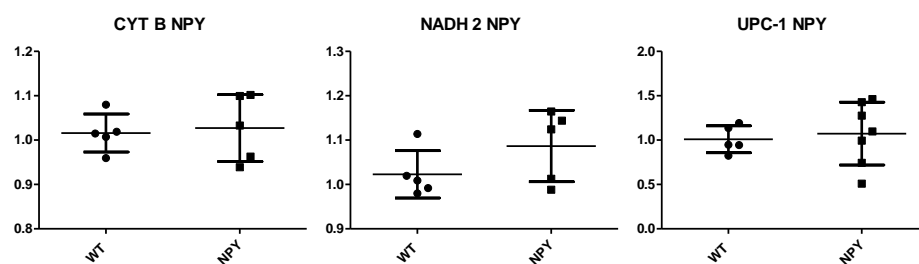
8.3.1 Muutokset ruskeassa rasvassa

NPY ja villityypin hiiristä tutkittiin mitokondriaalisen DNA:n geenien lisäksi myös UCP-1 geeni, joka liittyy olennaisesti ruskeaan rasvaan, joten sen pitäisi myös kertoa ruskean rasvan määrästä hiirissä. Kuvaajassa 12 verrataan NPY ja villityypin hiirien välisiä eroja eri geeneissä.



Kuvaaja 12. Ruskean rasvan mitokondriaalisen DNA:n erot NPY hiirien ja villityyppien välillä.

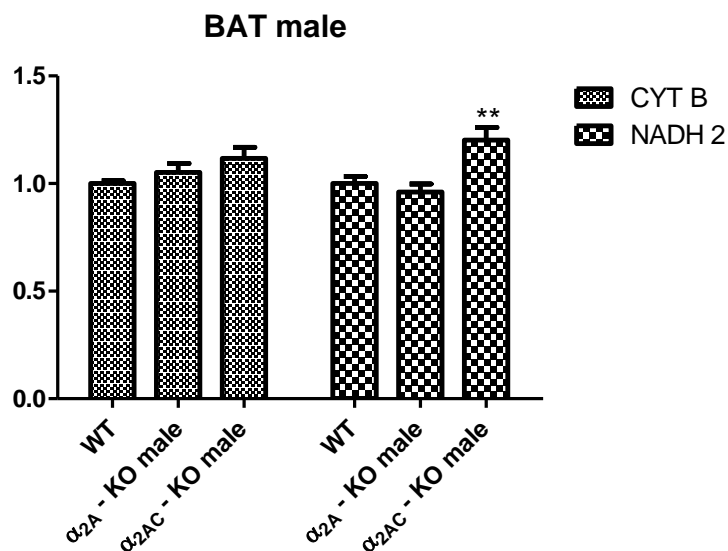
Kuvaajan perusteella voitiin tehdä se johtopäätös, että eroja ei juuri ollut NPY ja villityypin välillä. Tuloksista tehtiin myös analyysi Mann-Whitney:n t – testi, jonka tulokset varmistivat, että eroa NPY ja villityypin välillä ei ollut. Lisäksi tuloksista ajettiin D'Agostino & Pearson omnibus normality – testi, jossa tarkasteltiin tulosten hajontaa ja noudattivatko tulokset normaalijakaumaa. NPY ja villityyppien näytehajonnat ovat kuvaajassa 13. Normaalijakaumaa ei voitu tilastollisesti varmistaa, koska näytteiden lukumäärä ei ollut tarpeeksi suuri. t – testin arvot liitteenä 1.



Kuvaaja 13. Ruskean rasvan mitokondriaalisen DNA:n määrän hajonnat NPY – hiirissä ja villityypissä.

Kuvaajan 13 perusteella voitiin katsoa, että näytteet eivät noudattaneet normaalijakaumaa. Tämä täytyi huomioida valittaessa tilastollista menetelmää.

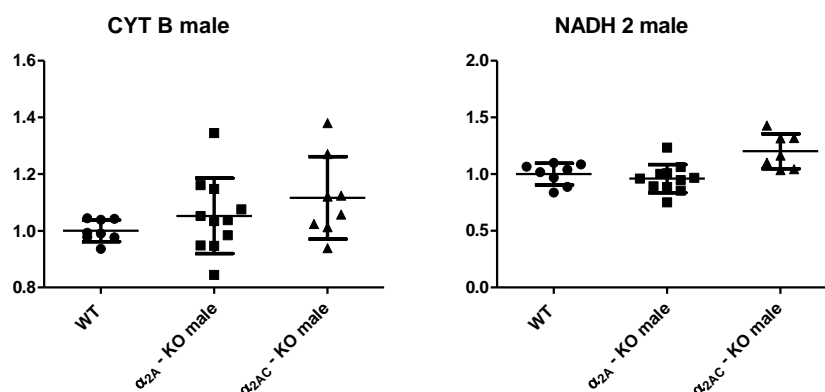
Kuvaajassa 14 esitetään urospuolisten α_2 – KO – hiiren ja villityyppien erot BAT - näytteissä.



Kuvaaja 14. Ruskean rasvan mitokondriaalisen DNA:n erot α_2 -KO -uroshiirien ja villityyppien välillä.

Kuvaajasta 14 nähdään, että eroja villityyppi (WT)- ja α_2 – KO – uroshiirien välillä oli jonkin verran. Tuloksista ajettiin yksisuuntainen ANOVA – testi, joka oli Dunnett'in multiple comparison – testi. Tilastollisen testin perusteella kuitenkin ainoastaan α_{2AC} – KO – ja villityyppien välillä oli tilastollinen merkittävyys (merkitty 2 tähdellä). Tämä eroavuus oli kuitenkin ainoastaan NADH 2 aluketta käytettäessä. Testin tulokset liitteessä 1.

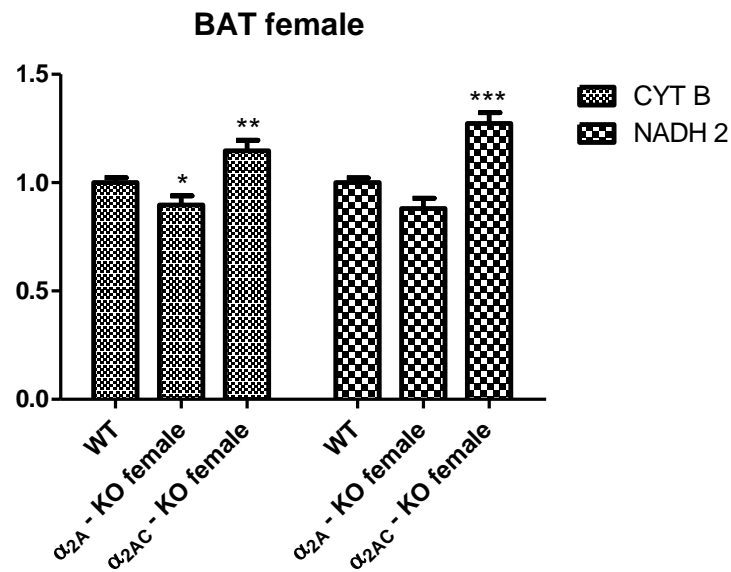
Lisäksi tuloksista tehtiin D'Agostino & Pearson omnibus normality – testi ja hajontakuvaajat (kuvaaja 15). Villityyppi- ja α_{2A} – KO – uroshiiristä oli tarpeeksi tuloksia, joiden perusteella tulokset noudattivat normaalijakaumaa.



Kuvaaja 15. Ruskean rasvan mitokondriaalisen DNA:n määrän hajonnat α_2 -KO - ja villityypin uroshiirissä.

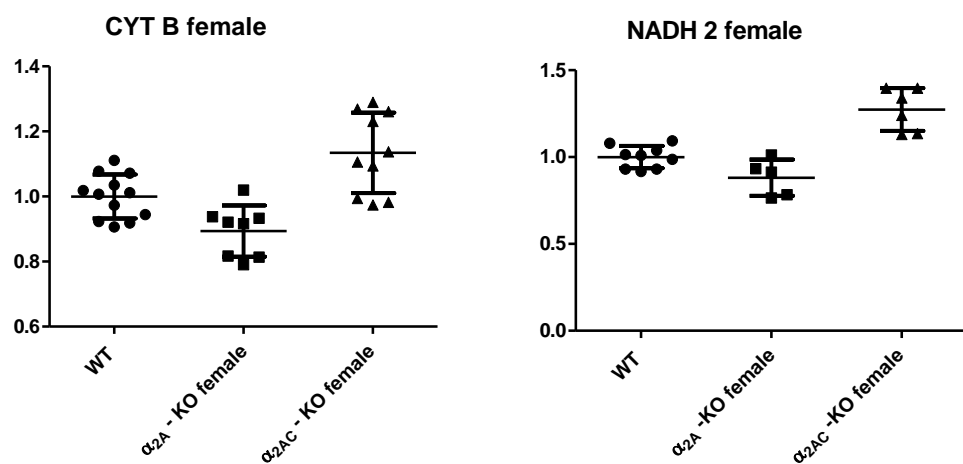
Tutkimuksessa saatiin ainoat selkeät tulokset α_{2AC} - KO - naarashiiristä, kuten kuvaajasta 16 voidaan nähdä. α_{2AC} - KO - hiirien molempien geenit, CYT B ja NADH 2, erosivat tilastollisesti villityypeistä (WT). Tulokset on merkitty kahdella ja kolmella tähdellä. Näissä α_{2AC} - KO - hiirissä olisi siis enemmän mtDNA:ta kuin villityypissä.

α_{2A} - KO - hiirilläkin oli toisessa geenissä muutoksia verrattuna villityyppiin. Tulosten mukaan siinä olisi vähemmän mtDNA:ta kuin villityypissä (merkitty yhdellä tähdellä). Koska eroa ei ollut NADH 2 - geenissä, asiasta ei voitu vetää mitään johtopäätöstä.



Kuvaaja 16. Ruskean rasvan mitokondriaalisen DNA:n erot α_2 -KO -naarashiirien ja villityyppien välillä.

Näistäkin tuloksista tehtiin yksisuuntainen ANOVA – testi sekä D'Agostino & Pearson omnibus normality – testi. ANOVA – testin tulokset näkyvät kootusti kuvaajassa 16 tähdillä merkittynä sekä liitteessä 1. Normality – testin tulokset näkyvät kuvaajassa 17.



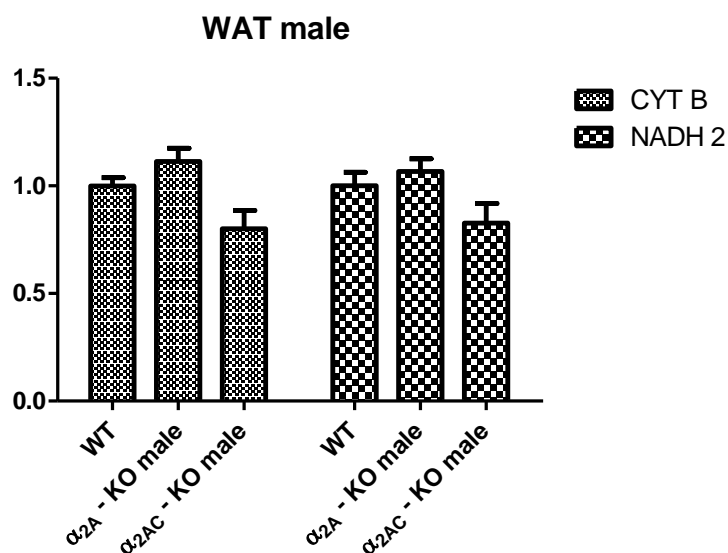
Kuvaaja 17. Ruskean rasvan mitokondriaalisen DNA:n määrän hajonnat α_2 -KO - ja villityypin naarashiirissä.

Hajontakuvaajan ja normality -testin perusteella tulokset noudattivat normaalihajontaa.

8.3.2 Muutokset valkoisessa rasvassa

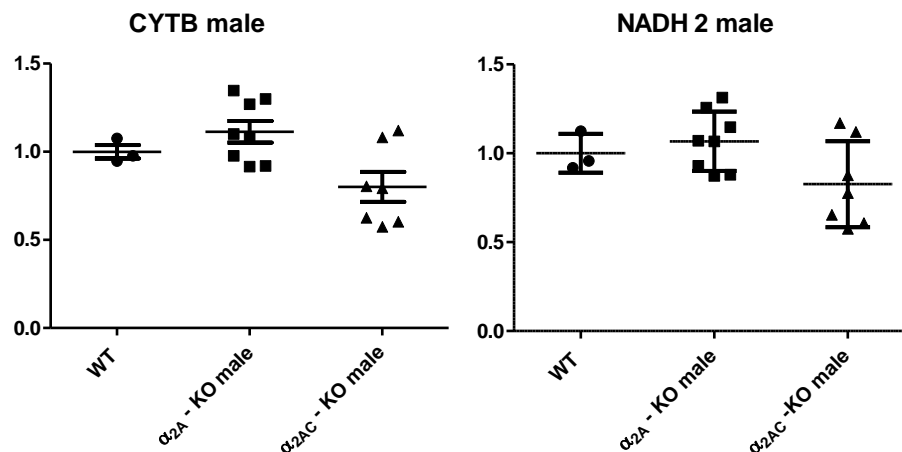
Tutkimuksessa haluttiin myös selvittää valkoisen rasvan mitokondriaalista DNA:ta, vaikka päätutkimus tehtiin ruskeasta rasvasta. Valkoisen rasvan tuloksiin tulee suhtautua kriittisesti, koska DNA – pitoisuudet olivat hyvin alhaisia ja niitä oli näytteissä hyvin eri määriä. Toisaalta asian ei pitäisi vaikuttaa lopullisiin tuloksiin, koska PCR – ajon tulokset normalisoitiin.

Kuvaajan 18 perusteella geenimuunneltujen hiirien ja villityypin (WT) välillä olisi eroja, mutta erot eivät kuitenkaan olleet niin suuria, että ne olisivat tilastollisesti merkittäviä. Ainoastaan WAT - näytteistä α_{2AC} – KO –hiirten NADH 2 geenissä olisi ero verrattuna villityyppiin. Tilastollisena testinä käytettiin yksisuuntainen ANOVA – testiä, joka oli Dunnett:in multiple comparison – testi. Tarkat tulokset liitteessä 2.



Kuvaaja 18. Valkoisen rasvan mitokondriaalisen DNA:n erot α_2 -KO uroshiirien ja villityyppien välillä.

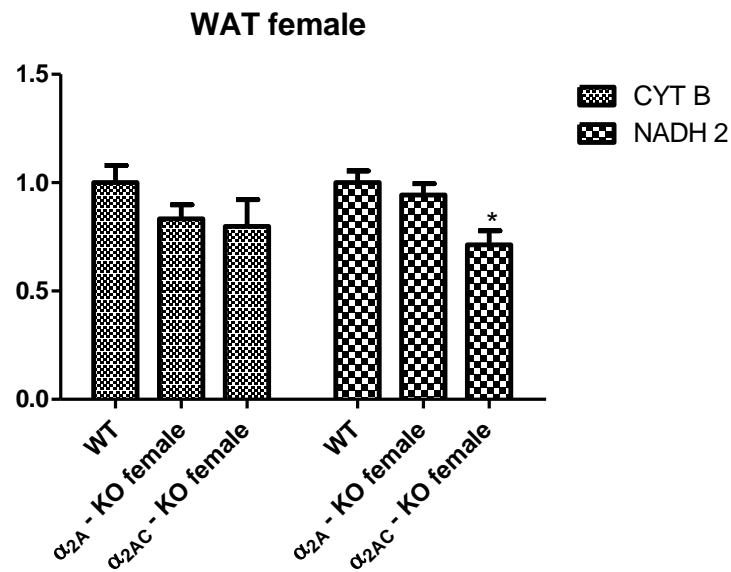
Tuloksista tehtiin myös D'Agostino & Pearson omnibus normality – testi. Testin hajontakuvaaja kuvaajassa 19.



Kuvaaja 19. Valkoisen rasvan mitokondriaalisen DNA:n määrän hajonnat α_2 - KO – ja villityypin uroshiirissä.

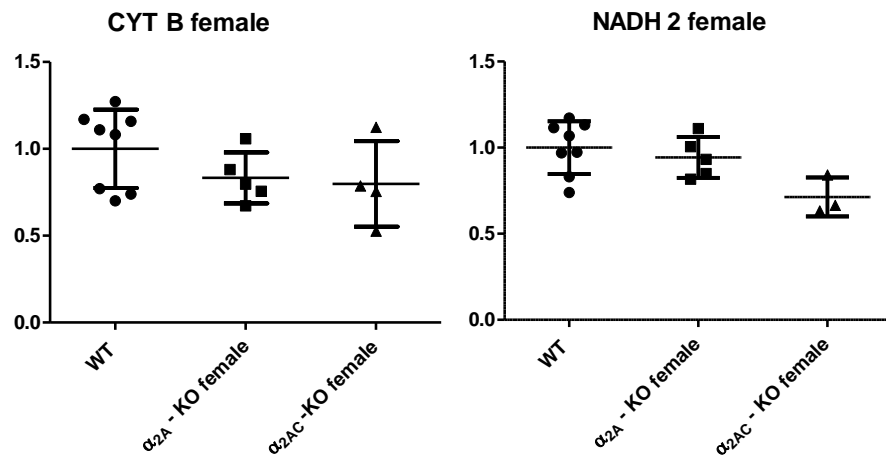
Ainoastaan kaksi ryhmää CYT B:ssä (vasemmalla puolella) olivat tarpeeksi isoja, jotta testi voitiin tehdä. NADH 2:ssa (oikealla puolella) vain yksi ryhmä oli tarpeeksi iso. Näiden perusteella tulokset noudattivat normaalijakaumaa.

Kuvaajassa 20 on tulokset valkoisen rasvan mitokondriaalisen DNA:n eroista naarailla. Eroa oli jälleen kuvaajan perusteella, mutta tilastollisesti ne eivät olleet merkittäviä. Ainoastaan α_{2AC} – KO –naaraalla olisi tilastollisesti merkittävästi vähemmän mitokondriaalista DNA:ta NADH 2 - geenillä mitattuna. Koska eroa ei ollut CYT B – geenillä mitattuna, ei asiasta voitu tehdä mitään johtopäätöstä. Yksisuuntaisen ANOVA – testin tulokset on liitteessä 2.



Kuvaaja 20. Valkoisen rasvan mitokondriaalisen DNA:n erot $\alpha 2$ -KO -naarashiirien ja villityyppien välillä.

Tutkittaessa noudattivatko tulokset normaalijakaumaa, käytettiin jälleen D'Agostino & Pearson omnibus normality – testiä, jonka hajontakuvaaja on kuvaajassa 21.



Kuvaaja 21. Valkoisen rasvan mitokondriaalisen DNA:n määrän hajonnat $\alpha 2$ -KO – ja villityypin naarashiirissä.

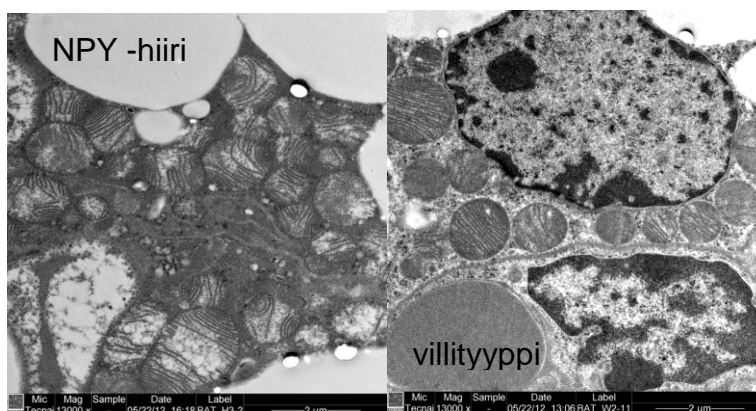
Näissäkin tuloksissa näytteitä oli lukumäärällisesti liian vähän, ainoastaan yksi ryhmä kummassakin geenistä oli tarpeeksi iso. Nämä ryhmät noudattivat normaalijakaumaa.

9 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tuloksena saatiin, että ruskeassa rasvassa varmasti ainoastaan yhden hiirilinjan naaraat erosivat mitokondriaalisen DNA:n määrältä villityypistä. Näillä α_{2AC} - KO - naarashiirillä molemmat mitokondriaalisen DNA:n geenit erosivat villityypistä tilastollisesti. Myös muita tilastollisia eroavaisuuksia oli geenimuunneltujen hiirien ja villityyppien välillä, mutta koska tilastollisia eroavaisuuksia ei saatu kuin toiselle geenille kahdesta, tulokset eivät olleet yksiselitteisiä.

Valkoisen rasvan mitokondriaalisessa DNA:ssa ei ollut juuri eroja, mutta tulokset eivät ole tällä menetelmällä kovin tarkkoja. Valkoisen rasvan DNA:n eristyksessä oli niin paljon ongelmia, että asiaa pitäisi tutkia uudelleen jollain toisella menetelmällä.

Oulun yliopistossa otettiin NPY - hiirien ruskeasta rasvasta fluoresenssimikroskoopilla kuvia. Näiden kuvien perusteella Oulussa laskettiin mitokondrioiden määriä ruskeassa näytteessä. Määriä verrattaessa villityyppiin tultiin loppupäätökseen, että määrissä ei ollut juuri eroja, mutta ne olivat erilaisia. Mitokondriot olivat pakkautuneet paljon tiiviimmin kuin villityypin ruskeassa rasvassa. Kuvat tukisivat myös tämän tutkimuksen tuloksia, mutta asian tutkimista jatketaan.



Kuva 9. Mitokondrioiden eroja ruskeassa rasvassa NPY –hiiren ja villityypin välillä (Oulun yliopisto).

Kuvassa 9 vasemmalla puolella on NPY hiiren ruskean rasvan mitokondrioita ja oikealla puolella villityypin. Mitokondriot näkyvät kuvassa ympyröinä, joiden pinnalla on viivoja.

α_2 – hiiristä tullaan ottamaan samanlaisia kuvia kuin NPY - hiiristä. Joitakin kuvia on jo otettu, mutta niissä näytteet eivät olleet hyviä. α_{2A} – hiiristä on myös tutkittu UCP-1 geenin toiminta. UCP-1 määrityksissä ei saatu tuloksia α_2 – KO – hiirien ja villityyppien välillä. UCP-1 määritykset kuitenkin kuvastaa geenin tuottoa, ei näistä tuloksista voida vetää suoria johtopäätöksiä tämän työn tutkimustulosten välille.

LÄHTEET

- 1 Hojna, S., Jordan, M. D., Kollias, H. & Pausova, Z. (2012) High-fat diet induces emergence of brown-like adipocytes in white adipose tissue of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research*. **35**: 3.
- 2 Svensson, P-A., Jern, M., Sjöholm, K. & Hoffmann, J.M. (2011) Gene expression in human brown adipose tissue. *International journal of molecular medicine*. **27**: 227-23.
- 3 Richard, D., Monge-Roffarello, B., Chechi, K., Labbé, S & Turcotte, E. (2012) Control and physiological determinants of sympathetically mediated brown adipose tissue thermogenesis. *Frontiers in Endocrinology*. **3**: 36.
- 4 Cannon B & Nedergaard J (2004) Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev*. **84**: 277–359.
- 5 Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N-J., Enerback, S. & Nuutila, P. (2009) Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *The New England journal of medicine*. **360**:15.
- 6 Niemi, M., Virtanen, I., & Vuorio, E. (1993) *Solu – ja molekyylibiologia*. 5. painos. WSOY, Porvoo, Suomi.
- 7 Rousset, S., Alves-Guerra, M-C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A-M., Bouillaud, F. & Daniel Ricquier, D. (2004) The Biology of Mitochondrial Uncoupling Proteins. *Diabetes*. **53**: supplement 1.
- 8 Enerbäck, S. (2009) The Origins of Brown Adipose Tissue. *The New England Journal of Medicine*. **360**: 2021-2023.
- 9 Kusminski, C. M. & Scherer, P. E. (2012) Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends in endocrinology & metabolism*. **23**: 8.
- 10 Posti, J. (2012) α_2 – adrenoceptor - mediated vascular responses induced by dexmedetomidine. Väitöskirja. Turku University, Turku, Suomi.
- 11 Scheinin, M. (2007) Adrenoseptoriagonistit (sympatomimeetit). Kirjassa: Koulu, Tuomisto (toim.) *Farmakologia ja toksikologia*. 7. painos. Medicina, Turku, Suomi.
- 12 Link, R. E., Stevens, M. S., Kulatunga, M., Scheinin, M., Barsh, G & Kobilka, B.K. (1995) Targeted inactivation of the gene encoding the mouse α_{2A} -adrenoceptor homolog. *Molecular pharmacology*. **48**: 55.
- 13 Lähdesmäki, J., Sallinen, J., Macdonald., Kobilka, B. K., Fagerholm, V. & Scheinin, M. (2002). Behavioral and neurochemical characterization of α_{2A} -adrenergic receptor knockout mice. *Neuroscience*. **113**: 2.
- 14 Ruohonen, S. T., Ruohonen, S., Gilsbach R., Savontaus, E., Scheinin, M. & Hein, L. (2012). Involvement of α_{2A} -Adrenoceptor subtypes A and C in glucose homeostasis and adrenaline-induced hyperglycemia. *Neuroendocrinology*. **96**: 1.
- 15 Lutz Hein, L., Altman, J. D. & Kobilka, B. K. (1999) Two functionally distinct α_2 -adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*. **402**: 181-184.

- 16 Savontaus, E., Fagerholm, V., Rahkonen, O & Scheinin, M. (2008) Reduced blood glucose levels, increased insulin levels and improved glucose tolerance in α_{2A} –adrenoceptor knockout mice. *European journal of pharmacology*. **578**: 2-3.
- 17 Sallinen, J., Haapalinna, A., Viitamaa, T., Kobilka, B.K. & Scheinin, M. (1998) Adrenergic α_{2C} –receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice. *The journal of neuroscience*. **18**: 8.
- 18 Allen, J.M. & Bloom, S.R. (1986) Neuropeptide Y: A putative neurotransmitter. *Neurochem int*. **8**: 1.
- 19 Ruohonen, S.T., Pesonen, U., Moritz, N., Kaipio, K., Røyttä, M., Koulou, M. & Savontaus, E. (2008) Transgenic mice overexpression neuropeptide Y in noradrenergic neurons, a novel model of increased adiposity and impaired glucose tolerance. *Diabetes*. **54**: 6.
- 20 Zeviani, M. & Antozzi, C. (1997) Mitochondrial disorders. *Molecular Human Reproduction*. **3**: 133-148.
- 21 Saccone, C. (1994) The evolution of mitochondrial DNA. *Current Opinion in Genetics and Development*. **4**: 875-881.
- 22 Heino, J. & Vuento, M. (2007) Biokemian ja solubiologian perusteet. 1. painos. WSOY Oppimateriaalit Oy.
- 23 Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A & Weiner, A. M. (1987) *Molecular biology of the gene*. Volume 1. 4. painos. The Benjamin/Cumming publishing company, Inc, California, USA.
- 24 Frey, T.G., Manella, C.A. (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Science*. **25**: 319-324.
- 25 Justo, R., Frontera, M., Pujol, E., Rodríguez-Cuenca, S., Lladó, I., García-Palmer, F. J., Roca, P & Gianotti, M. (2005) Gender-related differences in morphology and thermogenic capacity of brown adipose tissue mitochondrial subpopulations. *Life Science*. **76**: 10.
- 26 Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. (2010) *Geenitekniikka*. Turun ammattikorkeakoulu, Turku, Suomi.
- 27 Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D & Lang, H. (1974) Proteinase K from *Tritirachium album* limber. *European Journal of Biochemistry*. **47**: 1.
- 28 Brown, T.A. (2010) *Gene cloning & DNA analysis: an introduction*. 6. painos. Wiley-Blackwell, West Sussex, UK.
- 29 Qiagen handbook. Genomic DNA purification. Technical hints, application and protocols. (2002).
- 30 Quantification of nucleic acids using absorbance. Phenix research product. [http://www.phenixresearch.com/Images/TN_Quantification.pdf]. Viitattu 10.8.2012.
- 31 Wilson, I. G. (1997) Minireview, inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology*. **63**: 10.
- 32 Opel, K. L., Chung, D., McCord, B. R. (2010) A study of PCR inhibition mechanism Using real time PCR. *Journal of forensic sciences*. **55**: 1.
- 33 Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research*. **6**: 10.

- 34 Relative quantification using comparative C_T - getting started guide. (2006) Applied Biosystems, California, USA.
- 35 Qiagen. Critical factors for successful real-time PCR. Real-time PCR brochure 07/2010.
- 36 Applied Biosystems. Real-time PCR: Understanding Ct. Application note.
- 37 qPCR efficiency calculator. Thermo Scientific.
[http://www.finnzymes.fi/java_applets/qpcr_efficiency.html]
- 38 Finnzymes. Principles of qPCR (2009). Finnzymes Oy. Helsinki, Suomi.
- 39 Applied Biosystem. Guide to performing relative quantification of gene expression using real-time quantitative PCR. Kohta 7: Relative quantification of gene expression experimental design and analysis: relative standard curve method and comparative C_T method ($\Delta\Delta C_T$). s. 43 – 59.
- 40 Jin, P., Zhao, Y., Ngalame, Y., Panelli, M. C., Nagorsen, D., Monsurro, V., Smith, K., Su, H., Taylor, P. H., Marincola, F. M. & Wang, E. (2004) Selection and validation of endogenous reference genes using a high throughput approach. BMC genomics. **5**: 55.
- 41 Gentra Puregene handbook (2011). DNA purification from tissue using the Gentra Puregene tissue kit. 3. painos.
- 42 BioSpec – nano instruction manual. (2010)
- 43 Andreu, A. L., Martinez, R., Marti, R & García-Arumí, E. (2009) Quantification of mitochondrial DNA copy number: Pre-analytical factors. Mitochondrion. **9**: 4.
- 44 KAPA biosystem. KAPA SYBR © FAST qPCR Kit. Technical data sheet.

Tilastolliset testit ruskean rasvan tuloksista

Taulukko 1. Mann-Whitney t –testi NPY - ja villityyppi -hiiristä (WT).

Geeni	CYT B				
	P value	P value summary	Significant? P < 0.05?	One- or two-tailed P value?	Mann-Whitney U
NPY vs WT	0,6905	ns	No	Two-tailed	10,00
Geeni	NADH 2				
	P value	P value summary	Significant? P < 0.05?	One- or two-tailed P value?	Mann-Whitney U
NPY vs WT	0,2222	ns	No	Two-tailed	6,000
Geeni	UCP-1				
	P value	P value summary	Significant? P < 0.05?	One- or two-tailed P value?	Mann-Whitney U
NPY vs WT	0,6389	ns	No	Two-tailed	14,00

Taulukko 2. Ruskean rasvan Dunnett'in multiple comparison –testi α_2 – KO -ja villityyppi -hiiristä (WT).

Geeni	CYT B				
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
WT vs α_{2A} -KO male	-0,05247	0,9554	No	ns	-0.1815 to 0.07657
WT vs α_{2AC} -KO male	-0,1164	1,969	No	ns	-0.2552 to 0.02247
Geeni	NADH 2				
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
WT vs α_{2A} -KO male	0,03935	0,6766	No	ns	-0.09771 to 0.1764
WT vs α_{2AC} -KO male	-0,2019	3,116	Yes	**	-0.3545 to -0.04920

(jatkuu)

Taulukko 2 (jatkuu)

Geeni	CYT B				
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
WT vs α_{2A} -KO female	0,1062	2,509	Yes	*	0.007369 to 0.2050
WT vs α_{2AC} -KO female	-0,1343	3,383	Yes	**	-0.2270 to -0.04159
Geeni	NADH 2				
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
WT vs α_{2A} -KO female	0,1188	2,246	No	ns	-0.008696 to 0.2464
WT vs α_{2AC} -KO female	-0,2736	5,472	Yes	***	-0.3941 to -0.1531

Tilastolliset testit valkoisen rasvan tuloksista.

Taulukko 1. Valkoisen rasvan Dunnett'in multiple comparison –testi α_2 – KO -ja villityyppi -hiiristä (WT).

Geeni	CYT B				
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
WT vs α_{2A} -KO male	-0,1135	0,8996	No	ns	-0.4213 to 0.1943
WT vs α_{2AC} -KO male	0,1997	1,552	No	ns	-0.1141 to 0.5134
Geeni	NADH 2				
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
WT vs α_{2A} -KO male	-0,06707	0,5090	No	ns	-0,3885 to 0,2544
WT vs α_{2AC} -KO male	0,1737	1,293	No	ns	-0,1539 to 0,5014
Geeni	CYT B				
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
WT vs α_{2A} -KO female	0,1674	1,389	No	ns	-0.1287 to 0.4635
WT vs α_{2AC} -KO female	0,2016	1,557	No	ns	-0.1165 to 0.5197
Geeni	NADH 2				
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
WT vs α_{2A} -KO female	0,05703	0,7276	No	ns	-0,1372 to 0,2512
WT vs α_{2AC} -KO female	0,2863	3,076	Yes	*	0,05570 to 0,5169